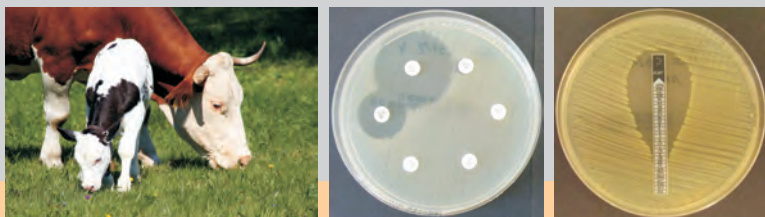


ANTIBIOTIKA-RESISTENZEN BEI VEROTOXIN-BILDENDEN *ESCHERICHIA COLI*-STÄMMEN, ISOLIERT AUS KOT- UND LEBENSMITTELPROBEN DER TIERART RIND

Nadine Aßmus



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Bülte

**Antibiotika-Resistenzen bei
Verotoxin-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen,
isoliert aus Kot- und Lebensmittelproben
der Tierart Rind**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

NADINE ABMUS
Tierärztin aus Kirchheimbolanden

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Bülte

Prof. Dr. K. Doll

Tag der Disputation: 26. Juni. 2009

**Meinen Eltern
und
meinem Freund Frank**

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

AßMUS, N. und M. BÜLTE (2008)

Empfindlichkeitsprüfung von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen aus Fäzes und Lebensmitteln der Tierart Rind. 49. Arbeitstagung des „Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene“ der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), 29. September bis 02. Oktober 2008, Garmisch-Partenkirchen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen und Einheiten	VII
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 <i>Escherichia coli</i>	2
2.1.1 Taxonomie	2
2.1.2 Vorkommen und Bedeutung	2
2.1.3 Resistenzen	3
2.2 Enterovirulente <i>E. coli</i> -Stämme	5
2.2.1 Verotoxin-bildende (VTEC)/Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)	7
2.2.2 Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	7
2.2.3 Enterotoxinogene <i>E. coli</i> (ETEC)	9
2.2.4 Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	10
2.2.5 Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAggEC)	11
2.2.6 Diffus-adhärenente <i>E. coli</i> (DAEC)	12
2.2.7 Nekrotoxische <i>E. coli</i> (NTEC)	12
2.2.8 Cytolethal distending toxin-producing <i>E. coli</i> (CLDTEC)	13
2.2.9 Cell-detaching (CDEC)/Diarrhea-associated haemolytic <i>E. coli</i> (DHEC)	13
2.3 Nomenklatur und Pathogenitätsfaktoren von VTEC/EHEC	14
2.3.1 VTEC, EHEC und <i>E. coli</i> O157:H7	14
2.3.2 Verotoxine	15
2.3.3 Weitere Virulenzfaktoren	20
2.4 Epidemiologische Situation von VTEC	22
2.4.1 Vorkommen bei Tieren	22
2.4.1.1 Hauswiederkäuer	22
2.4.1.2 Wildwiederkäuer	31
2.4.1.3 Schweine	33
2.4.1.4 Pferde	34
2.4.1.5 Kleine Haustiere	34
2.4.1.6 Geflügel und Wildvögel	36
2.4.2 Vorkommen in Lebensmitteln	37
2.4.3 Vorkommen bei Menschen	42
2.4.3.1 Vorkommen und Ausbruchsgeschehen	43

2.4.3.2	Krankheitsbild	46
2.4.3.3	Pathogenese	47
2.4.3.4	Beteiligte EHEC-Stämme	48
2.4.3.5	Übertragung und Risikofaktoren	51
2.5	Therapie bei vorliegenden EHEC-Infektionen	53
2.5.1	Antimikrobielle Chemotherapeutika	53
2.5.2	Alternative Therapiemethoden	56
2.5.3	Anwendbare Therapien	59
2.6	Wirkungsweise antimikrobieller Chemotherapeutika	59
2.6.1	Aminoglykoside	60
2.6.2	β -Lactam-Antibiotika	61
2.6.3	Chinolone/Fluorchinolone	62
2.6.4	Sulfonamid-Diaminobenzylpyrimidin-Kombination	63
2.6.5	Tetrazykline	64
2.7	Resistenz gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika	64
2.7.1	Definitionen	64
2.7.2	Grundlagen der Entwicklung und Mechanismen von Resistenzen	65
2.7.2.1	Aminoglykoside	66
2.7.2.2	β -Lactam-Antibiotika	67
2.7.2.3	Chinolone/Fluorchinolone	67
2.7.2.4	Sulfonamid-Diaminobenzylpyrimidin-Kombination	68
2.7.2.5	Tetrazykline	68
2.7.3	Ausbreitung von Resistenzgenen und resistenten Mikroorganismen	69
2.8	Resistenzlage bei VTEC	70
2.8.1	Resistenzsituation bei von Menschen isolierten VTEC-Stämmen	72
2.8.2	Resistenzsituation bei von Rindern isolierten VTEC-Stämmen	74
2.8.3	Resistenzsituation bei von anderen Hauswiederkäuern und Schweinen isolierten VTEC-Stämmen	77
2.9	Prävention und Surveillance von Resistenzen	79
2.10	Methoden zur Durchführung von Empfindlichkeitsprüfungen	81
2.10.1	Durchführungsvorschriften für Empfindlichkeitsprüfungen	81
2.10.2	Agardiffusionstest	82
2.10.3	Epsilon-Test (E-Test)	84
2.10.4	Dilutionsmethoden	85
3.	Eigene Untersuchungen	87
3.1	Material	87
3.1.1	Referenzstämme	87

3.1.2	VTEC-Prüfstämme aus der institutseigenen Sammlung.....	87
3.1.3	Auswahl der antimikrobiellen Wirkstoffe.....	90
3.1.4	Medien und Lösungen.....	93
3.1.5	Geräte und Labormaterialien.....	94
3.2	Methoden.....	96
3.2.1	Methode zur Einstellung der Bakteriendichte.....	96
3.2.2	Anzüchtung der VTEC- und Referenzstämmen.....	98
3.2.3	Agardiffusion.....	99
3.2.4	Epsilon-Test.....	101
3.2.5	Statistische Auswertung.....	103
4.	Ergebnisse.....	105
4.1	Einstellung der Bakteriendichte.....	105
4.2	Agardiffusion.....	107
4.3	Epsilon-Test.....	113
4.4	Vergleich der Resistenzen von VTEC-Stämmen aus Lebensmitteln und Kot.....	118
4.5	Abhängigkeit von Resistenzen und Virulenzfaktoren.....	119
4.6	Homogenitätstest zu den betrachteten Zeiträumen.....	121
4.7	Zeitliche Trends.....	126
5.	Diskussion.....	128
5.1	Gründe für die Empfindlichkeitsprüfung bei VTEC.....	128
5.2	Eigene Untersuchungen.....	130
5.2.1	Einstellung des Inokulums.....	133
5.2.2	Empfindlichkeitsprüfungen.....	134
5.2.3	Resistenzvergleich bei Stämmen aus Lebensmitteln und Kot.....	141
5.2.4	Zusammenhang von Resistenzen und Virulenzfaktoren.....	143
5.2.5	Homogenität zwischen den betrachteten Zeiträumen.....	145
5.2.6	Resistenzzunahme bzw. -abnahme.....	146
6.	Schlussfolgerungen.....	151
7.	Zusammenfassung.....	152
8.	Summary.....	154
9.	Literaturverzeichnis.....	156
10.	Anhang.....	193
10.1	Ergebnisse zur Einstellung der Keimdichte.....	193
10.2	Einbezogene VTEC-Stämme mit Resistenzergebnissen.....	196
	Erklärung.....	203

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nomenklatur und Einteilung von enterovirulenten <i>E. coli</i> -Stämmen	6
Tabelle 2: VT 1-Varianten bei <i>E. coli</i> -Stämmen	17
Tabelle 3: VT 2-Varianten bei <i>E. coli</i> -Stämmen	19
Tabelle 4: Nachweis von VTEC bei Wiederkäuern in Deutschland	24
Tabelle 5: Nachweis von VTEC bei Wiederkäuern in Europa	25
Tabelle 6: Nachweis von VTEC bei Wiederkäuern außerhalb Europas	26
Tabelle 7: Nachweis von VTEC bei Wildwiederkäuern	32
Tabelle 8: Nachweis von VTEC bei Schweinen	33
Tabelle 9: Nachweis von VTEC bei Pferden	34
Tabelle 10: Nachweis von VTEC bei kleinen Haustieren	35
Tabelle 11: Nachweis von VTEC bei Wildvögeln und Wirtschaftsgeflügel	37
Tabelle 12: Nachweis von VTEC in Fleisch und Fleischerzeugnissen in Europa	39
Tabelle 13: Nachweis von VTEC in Milch und Milchprodukten in Europa	40
Tabelle 14: Nachweis von VTEC in Lebensmitteln außerhalb Europas	40
Tabelle 15: Vorkommen von VTEC auf Schlachttierkörpern	42
Tabelle 16: Ausbrüche von EHEC-Infektionen in Deutschland	43
Tabelle 17: Ausbrüche von EHEC-Infektionen in Europa	45
Tabelle 18: Ausbrüche von EHEC-Infektionen außerhalb Europas	46
Tabelle 19: Antimikrobielle Resistenzen bei humanen VTEC-Stämmen	73
Tabelle 20: Antimikrobielle Resistenzen von VTEC-Stämmen bovinen Ursprungs	75
Tabelle 21: Antimikrobielle Resistenzen von VTEC-Stämmen (ovin, caprin, porcin)	77
Tabelle 22: Referenzstämme gemäß Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)	87
Tabelle 23: Übersichtstabelle zu einbezogenen VTEC-Stämmen mit Angabe der <i>vtx</i> -Gene und des <i>eae</i> -Gens	88
Tabelle 24: Übersichtstabelle zu einbezogenen VTEC-Stämmen aus Lebensmitteln bovinen Ursprungs mit Angabe der <i>vtx</i> -Gene und des <i>eae</i> -Gens	89
Tabelle 25: Übersichtstabelle zu einbezogenen VTEC-Stämmen aus Fäzes bovinen Ursprungs mit Angabe der <i>vtx</i> -Gene und des <i>eae</i> -Gens	90
Tabelle 26: Belegung der im Agardiffusionstest verwendeten Antibiotika-Testplättchen	91
Tabelle 27: Verwendete Antibiotika-Teststreifen für die E-Test-Methode	92
Tabelle 28: Medien und Lösungen	93
Tabelle 29: Geräte	94
Tabelle 30: Labormaterialien	95
Tabelle 31: Hemmhofbewertungsschlüssel für <i>Enterobacteriaceae</i>	100
Tabelle 32: Hemmhofbewertungsschlüssel für Referenzstämme	101
Tabelle 33: Standards zur Interpretation der MHK-Werte für <i>Enterobacteriaceae</i>	103
Tabelle 34: Qualitätskontrollbereiche der MHK-Werte für Referenzstämme	103

Tabelle 35: Ergebnisse der durchschnittlichen Keimdichte der VTEC-Stämme	105
Tabelle 36: Ergebnisse der durchschnittlichen Keimdichte der Referenzstämme	106
Tabelle 37: Auflistung unempfindlicher VTEC-Stämme mit Angabe der Isolationsjahre	108
Tabelle 38: Auflistung unempfindlicher VTEC-Stämme mit Pathogenitätsfaktoren	112
Tabelle 39: MHK-Werte der VTEC-Stämme aus bovinen Fäzes	114
Tabelle 40: MHK-Werte der VTEC-Stämme aus Lebensmitteln bovinen Ursprungs.....	115
Tabelle 41: Gegenüberstellung der bei VTEC-Stämmen aus Lebensmitteln (n = 140) sowie aus Kotproben (n = 114) bovinen Ursprungs ermittelten Resistenzen	119
Tabelle 42: Zusammenhang zwischen Resistenzen und Virulenzgenen.....	120
Tabelle 43: Zusammenhang zwischen Resistenzen und dem Vorkommen des <i>eae</i> -Gens.....	121
Tabelle 44: Betrachtung des Resistenzvorkommens gegen alle getesteten Antibiotika	122
Tabelle 45: Betrachtung des Resistenzvorkommens gegenüber einzelnen Wirkstoffen	123
Tabelle 46: Beobachtungszeiträume für den Test auf Homogenität	145
Tabelle 47: Ergebnisse zur Erfassung der Keimdichte der VTEC-Stämme	193
Tabelle 48: Ergebnisse zur Erfassung der Keimdichte der Referenzstämme	194
Tabelle 49: Einbezogene VTEC-Stämme aus Rinderkot mit Resistenzergebnissen	196
Tabelle 50: Einbezogene VTEC-Stämme aus Lebensmitteln mit Resistenzergebnissen.....	199

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: In Deutschland gemeldete Fälle an Erkrankungen mit EHEC bzw. HUS	44
Abbildung 2: Mögliche Übertragungswege von und Risikofaktoren für VTEC-Infektionen (in Anlehnung an ARMSTRONG et al., 1996 und BÜLTE, 2002)	52
Abbildung 3: Hemmhöfe bei einem durchgeführten Agardiffusionstest zur Resistenzbestimmung bei einem VTEC-Stamm	83
Abbildung 4: Epsilon-Test zur Resistenzbestimmung von VTEC-Stämmen am Beispiel von Ampicillin.....	85
Abbildung 5: Berechnungsbeispiel zur Erfassung der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE). 98	
Abbildung 6: Ergebnisse der mittels Agardiffusion gegenüber 11 Antibiotika getesteten VTEC-Stämme	109
Abbildung 7: Darstellung einfach und mehrfach resistenter Stämme aus Lebensmitteln ...	110
Abbildung 8: Darstellung einfach und mehrfach resistenter sowie mäßig empfindlicher Stämme aus Kot	110
Abbildung 9: Anzahl und Prozentanteile sensibler und resistenter Stämme aus Lebensmitteln	117
Abbildung 10: Anzahl und Prozentanteile sensibler, resistenter und intermediär-empfindlicher Stämme aus Kot	117
Abbildung 11: Resistenzhäufigkeiten der Stämme aus Lebensmitteln	126
Abbildung 12: Resistenzhäufigkeiten der Stämme aus Kot.....	127

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen und Einheiten

%	Prozent
+	positiv, plus
-	negativ, minus
>	größer als
≥	größer oder gleich
<	kleiner als
≤	kleiner oder gleich
®	geschütztes Markenzeichen
TM	Markenzeichen (engl.: <u>trademark</u>)
§	Paragraph
°C	Grad Celsius
µg	<u>Mikrogramm</u>
µl	<u>Mikroliter</u>
µm	<u>Mikrometer</u>
aad-Gen	<u>Aminoglykosid-Adenotransferase-Gen</u>
A/E	<u>attaching and effacing</u>
AEEC	<u>attaching and effacing Escherichia coli</u>
AM	<u>Ampicillin</u>
AMC	<u>Amoxicillin/Clavulansäure</u>
Aqua bidest.	<u>Aqua bidestillata</u>
Aqua dest.	<u>Aqua destillata</u>
ARBAO	<u>Antibiotic Resistance in Bacteria of Animal Origin</u>
ATCC	<u>American Type Culture Collection, Manassas, USA</u>
ATP	<u>Adenosintriphosphat</u>
a _w	<u>activity of water (Wasseraktivität)</u>
BHI	<u>Hirn-Herz-Bouillon (engl.: brain-heart-infusion broth)</u>
BSAC	<u>British Society for Antimicrobial Chemotherapy</u>
bzw.	<u>beziehungsweise</u>
ca.	<u>circa</u>
CDC	<u>Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA</u>
CDT, CDLT	<u>cytolethal distending toxin</u>
CIP	<u>Ciprofloxacin</u>
CLDTEC	<u>cytolethal distending toxin-producing Escherichia coli</u>
CLSI	<u>Clinical and Laboratory Standards Institute (ehemals NCCLS)</u>
cm	<u>Zentimeter</u>
CO ₂	<u>Kohlendioxid</u>
CTX	<u>Cefotaxim</u>
CXM	<u>Cefuroxim</u>
DAEC	<u>diffus-adhärente Escherichia coli</u>
DANMAP	<u>Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme</u>
DF	<u>Durchfall</u>
dfr-Gen	<u>Dihydrofolatreduktase-Gen</u>
DGHM	<u>Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie</u>
DGI	<u>Deutsche Gesellschaft für Infektiologie</u>
d.h.	<u>das heißt</u>
DIN	<u>Deutsches Institut für Normung, Berlin</u>
DVG	<u>Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft</u>
DNA	<u>desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)</u>

<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>eae</i> -Gen	<i>E. coli</i> attaching and effacing-Gen
EAggEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EAST1	EAggEC heat stable Enterotoxin
EC	European Commission (Europäische Kommission)
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
Ehly [<i>hly</i> _{EHEC}]	Enterohämolysin [kursiv: Genbezeichnung]
EIEC	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
engl.	englisch
EPEC	enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ESAC	European Surveillance of Antimicrobial Consumption
ESBL	expanded spectrum β -lactamases (Breitspektrum- β -Lactamasen)
EspP [<i>espP</i>]	extrazelluläre Serin-Protease [kursiv: Genbezeichnung]
et al.	und andere (lateinisch: <i>et alibi</i>)
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
Gb ₂	Galabiosylceramid
Gb ₃	Globotriosylceramid
Gb ₄	Globotetraosylceramid
GENARS	German Network on Antimicrobial Resistance Surveillance
GM	Gentamicin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HC	Hämorrhagische Colitis
HHD	Hemmhofdurchmesser
Hrsg.	Herausgeber
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
IfSG	Infektionsschutzgesetz
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
kbp	Kilo-Basenpaare
LEE	locus of enterocyte effacement
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LVL	Levofloxacin
MDa	Megadalton
MEM	Meropenem
MHK	Minimale Hemmkonzentration (engl.: MIC; minimum inhibitory concentration)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Anzahl
NA	Nalidixinsäure (engl. <i>nalidixic acid</i>)
NaCl	Natriumchlorid
n.d.	nicht durchgeführt
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NM	non motile (unbeweglich)
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NSAID	Nichtsteroidales Antiphlogistikum (engl. <i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>)

NTEC	<u>n</u> ekro <u>t</u> oxische <i><u>E</u>scherichia <u>c</u>oli</i>
O-Antigen	somatisches Antigen
p	Wahrscheinlichkeit
PBP	<u>P</u> enicillin- <u>b</u> indende <u>P</u> roteine
PC-Agar	<u>P</u> late <u>C</u> ount-Agar
PEG	<u>P</u> aul <u>E</u> hrlich <u>G</u> esellschaft
PFGE	<u>P</u> uls <u>f</u> eld <u>g</u> e <u>l</u> e <u>k</u> trophorese
RAPD	<u>r</u> andom <u>a</u> mplification of <u>p</u> olymorphic <u>D</u> NA
ref.	<u>r</u> eferiert
RKI	<u>R</u> obert <u>K</u> och- <u>I</u> nstitut
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
SCVPH	<u>S</u> cientific <u>C</u> ommittee on <u>V</u> eterinary Measures relating to <u>P</u> ublic <u>H</u> ealth der Europäischen Kommission
SF	<u>S</u> orbitol- <u>f</u> ermentierend
SLT	<u>S</u> higa- <u>l</u> ike- <u>T</u> oxin
sp./spp.	<u>S</u> pezies (Singular/Plural)
ssp.	<u>S</u> ubspezies
STEC	<u>S</u> higa- <u>T</u> oxin-bildende <i><u>E</u>scherichia <u>c</u>oli</i>
Stx [<i>stx</i>]	<u>S</u> higa- <u>T</u> oxin [kursiv: Shiga-Toxin-Gen]
SXT	Cotrimoxazol (<u>S</u> ulfametho <u>x</u> azol/ <u>T</u> rimethoprim)
TE	<u>T</u> etrazyklin
Tir [<i>tir</i>]	<u>t</u> ranslocated <u>i</u> ntimin <u>r</u> eceptor [kursiv: Tir-Gen]
tRNA	<u>t</u> ransfer <u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid
TTP	<u>t</u> hrombotisch- <u>t</u> hrombozytopenische <u>P</u> urpura
u.a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
v.a.	<u>v</u> or <u>a</u> llem
VT [<i>vtx</i>]	<u>V</u> erotoxin [kursiv: Verotoxin-Gen]
VTEC	<u>V</u> erotoxin-bildende <i><u>E</u>scherichia <u>c</u>oli</i> / <u>v</u> erotoxinogene <i><u>E</u>scherichia <u>c</u>oli</i>
YOPIS	<u>y</u> oung, <u>o</u> ld, <u>p</u> regnant and <u>i</u> mmunocompromised <u>s</u> egments of the public

1. Einleitung

Escherichia coli sind sowohl beim Menschen als auch bei annähernd allen Säugetieren in der physiologischen Darmflora vorhanden. Große und kleine Wiederkäuer, aber vornehmlich Rinder, sind als Reservoir für eine Gruppe gesundheitlich bedenklicher Stammformen dieser Spezies, die enterovirulenten Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC), anzusehen. Bei diesen Tierarten werden VTEC weltweit nachgewiesen. Diese Erreger lassen sich häufiger auch in Lebensmitteln bovinen Ursprungs finden (BÜLTE und GOLL, 2006). Eine Infektion des Menschen mit VTEC ist meist durch den direkten Kontakt zu Rindern bzw. anderen Wiederkäuern sowie durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel boviner Herkunft bedingt. Auch die Transmission von Mensch zu Mensch stellt einen wichtigen Infektionsweg dar (RKI, 2008a).

Die in der Literatur aufgeführten Resistenzhäufigkeiten gegenüber Antibiotika bei VTEC-Stämmen von Rindern und Menschen differieren, wobei die Gefahr der Übertragung resistenter Erreger vom Rind auf den Menschen regelmäßig thematisiert wird (EFSA, 2008). Obwohl humane VTEC-Infektionen nur in Ausnahmefällen antibakteriell zu therapieren sind (SCHOLZ et al., 2002), resultiert in der Ausbreitung resistenter VTEC eine Gefährdung zukünftiger Behandlungsstrategien, weshalb ein Resistenzmonitoring dieses pathogenen Erregers zur Sicherung der öffentlichen Gesundheit erforderlich ist (SCHROEDER et al., 2002b). Diese Ausgangssituation ist der Ansatzpunkt für die innerhalb dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen zur Empfindlichkeitsprüfung von den in der Stammsammlung des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde vorliegenden VTEC-Stämmen aus Kot und Lebensmitteln der Tierart Rind. Im ersten Durchgang sollten diese 254 VTEC-Stämme (140 Stämme aus Lebensmittelproben, 114 Stämme aus Kotproben) mittels der Agardiffusionsmethode auf mögliche Resistenzen gegenüber 11 ausgewählten antimikrobiellen Wirkstoffen überprüft werden, um so eine Einteilung in die Kategorien „sensibel“, „intermediär-empfindlich“ und „resistent“ vornehmen zu können. Nachfolgend war eine erneute Untersuchung aller als unempfindlich eingestuftten Erreger mittels der Epsilon-Test- (E-Test) Methode vorgesehen. Ziel war die Erfassung der Resistenzsituation der aus den beiden Matrices innerhalb eines mehrjährigen Intervalles kultivierten bovinen VTEC-Stämme. Dabei sollte eine Aussage über eine mögliche Resistenzzunahme oder -abnahme (1987-2002) sowie über eventuelle signifikante Unterschiede der Resistenzhäufigkeiten beim Vergleich von Stämmen aus Lebensmittel- und Kotproben getroffen werden.

2. Literaturübersicht

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 Taxonomie

Escherichia coli (*E. coli*) gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und sind gramnegative, fakultativ anaerobe, sporenlose, Oxidase-negative und Katalase-positive stäbchenförmige Bakterien mit einer Größe von 1,1-1,5 µm x 2,0-6,0 µm. Die meisten Stämme sind durch ihre peritriche Begeißelung beweglich und bilden eine Kapsel aus. Das Wachstumsoptimum liegt bei 37 °C. Neben *E. coli* werden unter dem Genus *Escherichia* im „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology“ desweiteren *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* und *E. vulneris* aufgeführt (HOLT et al., 1994). Im Jahre 2003 wurden von HUYS et al. die Spezies *E. albertii* beschrieben, welche aus Stuhlproben von an Diarrhö erkrankten Kindern in Bangladesch isoliert worden war. Eine weitere Charakterisierung dieser neuen Spezies fand zu einem späteren Zeitpunkt durch die Arbeitsgruppe von HYMA statt (HYMA et al., 2005). Im Jahr 1885 wurde *E. coli* erstmals durch den Kinderarzt Dr. Theodor Escherich beschrieben, der diese Stämme aus dem Stuhl von Säuglingen isolierte und zu dessen Ehren dieser Spezies im Jahr 1919 der Name *Escherichia coli* zugeteilt wurde (BÜLTE und GOLL, 2006). Nach ØRSKOV und ØRSKOV (1984) werden *E. coli* nach dem modifizierten Kaufmann-Schema nach ihren Oberflächen- (O), Geißel- (H: von Hauch) und Kapsel- (K) Antigenen in verschiedene Serovare eingeteilt.

2.1.2 Vorkommen und Bedeutung

E. coli gehören bei Menschen und warmblütigen Tieren zur Normalflora des Dickdarms, wobei Meerschweinchen und Chinchillas eine Ausnahme darstellen. Trotz der je nach Tierart auftretenden Keimzahlen zwischen 10^4 bis 10^9 KBE/g machen sie in der Eubiose maximal 1 % der Darmflora aus (ROLLE und MAYR, 1993). Die Besiedelung des humanen Gastrointestinaltraktes durch diesen Mikroorganismus erfolgt bereits innerhalb weniger Stunden nach der Geburt (KAPER et al., 2004). Ungeachtet der Tatsache ihres kommensalistischen Vorkommens sind *E. coli* auch als fakultativ pathogene Krankheitserreger anzusehen. Außerhalb des Darmtraktes können sie unter gewissen Voraussetzungen zu Erkrankungen wie Harnwegsinfektionen, Septikämien und Meningitiden

führen. Neben den fakultativ pathogenen Infektionserregern treten obligat pathogene Stämme (aufgrund bestimmter Virulenzfaktoren) auf. Diesen sind sowohl die Erreger intestinaler Infektionen anzurechnen (BÜLTE und GOLL, 2006), als auch die Erreger extraintestinaler Erkrankungen, die als uropathogene (UPEC), nephropathogene (NPEC) und meningoseptische bzw. septischpathogene *E. coli* (SPEC) ausgewiesen werden (RKI, 1996a). Die Erreger intestinaler Infektionen werden in Kapitel 2.1.2 näher erläutert.

In der Humanmedizin wird der größte Anteil bakterieller Infektionen durch *E. coli* verursacht (BÜLTE und GOLL, 2006). Analog zur Situation bei Menschen sind diese Erreger auch bei Tieren häufig an Infektionen beteiligt und resultieren in schwerwiegenden Erkrankungen. Während bei Jungtieren ein besonderes Augenmerk auf Diarrhöen, Septikämien, Dysenterien und die Ödemkrankheit der Absatzferkel zu richten ist, sind bei adulten Tieren Mastitiden, Harnwegs- und Wundinfektionen, das Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndrom der Sauen und die Coligranulomatose des Geflügels zu berücksichtigen. Bei Papageien treten neben Enteritiden und Septikämien Eileiterentzündungen, Arthritiden und Luftsackentzündungen in Erscheinung. Auch eine Beteiligung am Zwingerhusten des Hundes wird thematisiert (ROLLE und MAYR, 2002). In der Lebensmittelhygiene erfüllen *E. coli* eine Funktion als Markerorganismus für eine ungenügende Hygiene bzw. für eine fäkale Verunreinigung. Dieses ist in der Tatsache begründet, dass der Darmtrakt von Menschen und den meisten Säugetieren als natürliches Habitat dieses Erregers anzusehen ist (BÜLTE und GOLL, 2006). Die Untersuchung auf *E. coli* in Lebensmitteln ist daher auch in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien (ANONYMOUS, 2005, ergänzt durch die Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 [ANONYMOUS, 2007]) vorgeschrieben.

2.1.3 Resistenzen

E. coli finden in verschiedenen Monitoring-Programmen als Indikatororganismen für die Bestimmung des Resistenzstatus der enteralen Mikroflora bei Menschen und Nutztieren Verwendung (TEUBER, 1999). Studien bezüglich der Empfindlichkeit dieses Erregers gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen belegen demnach eine weltweite Verbreitung von Resistenzen sowie einen stetigen Anstieg innerhalb der letzten Jahre (VON BAUM und MARRE, 2005; ROLLE und MAYR, 2002; EARSS, 2006). Besorgnis erregend ist darüber hinaus die Zunahme von Keimen, die gegen multiple Antibiotika Unempfindlichkeiten aufweisen. Als ursächliche Einflussfaktoren für die Resistenzzunahme sind der übermäßige Gebrauch

antimikrobieller Wirkstoffe in der Human- und Veterinärmedizin sowie der Einsatz in Landwirtschaft, Pflanzenschutz und Fischzuchten beschrieben (VON BAUM und MARRE, 2005; FLUGS, 2007). Unempfindlichkeiten werden häufig gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika wie Aminopenicillinen, Cotrimoxazol, Fluorchinolonen, Cephalosporinen, Carbapenemen und Aminoglykosiden aufgezeigt, welche bei *E. coli*-Infektionen Verwendung finden (KRESKEN et al., 1999). Im Rahmen von Untersuchungen in europäischen Krankenhäusern (2001-2005) erwiesen sich *E. coli*-Stämme zwischen 26 % und 77 % gegen Aminopenicilline als resistent. Die Resistenzzunahme bei Fluorchinolonen wurde als verheerend dargelegt. Insgesamt gesehen wurden bei den einbezogenen Stämmen häufig Unempfindlichkeiten gegenüber mehreren Wirkstoffklassen ermittelt (EARSS, 2006). Versuche der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (PEG) in Deutschland, Österreich und der Schweiz (überwiegend in Krankenhäusern der Maximalversorgung) lieferten für *E. coli*-Stämme aus unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien Resistenzzunahmen gegenüber Ampicillin von ca. 22 % auf über 50 % (1975-2004). Auch gegenüber Ciprofloxacin (14,5 auf 21,9 %), Cotrimoxazol (31,7 auf 32,9 %), Doxycyclin (34,9 auf 35,8 %) und weiteren Antibiotika waren in den Jahren 2001 bis 2004 zunehmende Resistenzhäufigkeiten zu verzeichnen (KRESKEN, 2005; KRESKEN et al., 2006). In einer ebenfalls auf dieser Fragestellung beruhenden Ermittlung kamen während der Überprüfung von *E. coli*-Stämmen im Stuhl von ambulanten Patienten im Alter von 40 bis 74 Jahren gegen 21 antimikrobielle Wirkstoffe hingegen geringere Resistenzen zum Vorschein (Ampicillin: 16,7 %; Doxycyclin: 14,0 %; Mezlocillin: 13,5 %; Piperazillin: 12,3 % und Cotrimoxazol: 8,8 %; andere bei 1,7 % oder darunter). Diese Erhebungen besagen zudem, dass von Patienten mit einem weniger als ein Jahr zurückliegenden Krankenhausaufenthalt isolierte Stämme häufiger Resistenzen aufweisen als Stämme von Beteiligten ohne stationären Aufenthalt. Demgegenüber ließ sich kein Zusammenhang zwischen Fleischkonsum und den erhobenen Resistenzdaten aufzeigen (MARRE et al., 2002).

E. coli-Stämme aus Lebensmitteln wiesen im Rahmen eines europaweiten Resistenzmonitorings geringere Unempfindlichkeiten auf als Stämme tierischen Ursprungs, wobei sich *E. coli* von Rindern und Schweinen seltener als resistent darstellten als Stämme von Hühnern. Zu einem Großteil fanden sich bei Stämmen boviner und porciner Herkunft Resistenzen gegenüber Ampicillin und Tetracyclin, wohingegen von Geflügel kultivierte Stämme häufig Unempfindlichkeiten gegen das Chinolon Nalidixinsäure demonstrierten (EFSA, 2006).

2.2 Enterovirulente *E. coli*-Stämme

Es existieren stark adaptierte *E. coli*-Stämme, welche durch spezifisch erworbene Pathogenitätsfaktoren zur Anpassung an neue Nischen befähigt und Ursache eines breiten Spektrums humaner Erkrankungen sind (KAPER et al., 2004). Neben den uropathogenen (UPEC), nephropathogenen (NPEC) und meningoseptischen bzw. septisch-pathogenen *E. coli* (SPEC), die extraintestinale Erkrankungen verursachen (RKI, 1996a), sind auch darmpathogene *E. coli* präsent. Dieser Gruppe sind die enteropathogenen (EPEC), enterotoxinogenen (ETEC), enteroinvasiven (EIEC), enteroaggregativen (EAggEC), diffus-adhärenenten (DAEC), nekrotoxischen (NTEC), cytolethal distending toxin-producing (CLDTEC), cell-detaching (CDEC) bzw. diarrhea-associated haemolytic (DHEC) sowie die Verotoxin-bildenden (VTEC) mit den enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) zugehörig. Die genannten Pathovaren werden in den folgenden Kapiteln abgehandelt und sind in Tabelle 1 (nach BÜLTE und GOLL, 2006) detailliert dargestellt. Diese enterovirulenten *E. coli*-Stämme führen regelmäßig zu intestinalen Erkrankungen wie beispielsweise Diarrhö, Reisediarrhö und Enteritis bei Kindern (VON BAUM und MARRE, 2005) und werden aufgrund der unterschiedlichen Pathogenitätsfaktoren den differenten Pathovaren zugeordnet (BEUTIN, 1990; RKI, 1996a). Teilweise rufen diese Erreger auch Erkrankungen beim Tier hervor; dabei handelt es sich um Stämme von EPEC, VTEC und ETEC. Daneben existiert ein tierspezifisches Pathovar, welches als „avian pathogenic *E. coli*“ (APEC) bezeichnet wird und extraintestinale Erkrankungen wie Infektionen des Respirationstraktes, Perikarditis und Septikämie beim Geflügel bewirkt (KAPER et al., 2004). Die Identifizierung erfolgt biochemisch, serologisch oder über die Bestimmung der Virulenzfaktoren. Letzteres gilt als einzig sicheres Verfahren zur Differenzierung der Pathovaren (RKI, 2002). Die Virulenzgene sind häufig in mobilen genetischen Elementen verankert, so dass sie auf andere Stämme übertragbar sind und dort ein geändertes Spektrum an Virulenzeigenschaften hervorbringen können (KAPER et al., 2004). Gemäß dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) sind alle darmpathogenen *E. coli* meldepflichtig (ANONYMOUS, 2000).

Tabelle 1: Nomenklatur und Einteilung von enterovirulenten *E. coli*-Stämmen
(nach BÜLTE und GOLL, 2006)

Akronym	Bezeichnung	Unterteilung	Virulenz-eigenschaft	Erkrankung	Lebensmittel-hygienische Bedeutung
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>	class I class II	Haftungsfähigkeit (LEE ¹⁾ , EAF-Plasmid ²⁾ Haftungsfähigkeit (LEE)	Säuglingsdiarrhö	+
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>	LT ⁺ -Stämme ³⁾ ST ⁺ -Stämme ⁴⁾	Enterotoxine, Kolonisationsfaktoren	Cholera-ähnliche Reisediarrhö	++
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>		Invasivität, Enterotoxine	Ruhr-ähnliche Diarrhö	+
VTEC/ STEC	verotoxinogene/ Shiga-Toxin-bildende <i>E. coli</i>		Verotoxine/ Shiga-Toxine	einige Stämme: Diarrhö, selten HC ⁵⁾ , HUS ⁶⁾ , TTP ⁷⁾	++
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>		Verotoxine/Shiga-Toxine, Haftungsfähigkeit (LEE), (Enterohämolysin)	Diarrhö, HC ⁵⁾ , HUS ⁶⁾ , TTP ⁷⁾	+++
EAggEC/ EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>		Enterotoxin (EAST1 ⁸⁾), Haftungsfähigkeit	persistierende Diarrhö, Reisediarrhö	+
DAEC	diffus-adhärente <i>E. coli</i>		Adhäsion	infantile Diarrhö	-
NTEC	nekrotxische <i>E. coli</i>		CNF ⁹⁾ 1 CNF 2	Diarrhö, extraintestinale Erkrankungen	-
CLDTEC	cytolethal distending toxin- producing <i>E. coli</i>		cytolethal distending toxin (CDT I-V ¹⁰⁾)	(infantile Diarrhö)	-
CDEC/ DHEC	diarrhea-associated haemolytic <i>E. coli</i>		(α -Hämolysin)	(infantile Diarrhö)	-

¹⁾ locus of enterocyte effacement
⁵⁾ hämorrhagische Colitis
⁸⁾ EAggEC heat stable toxin 1
²⁾ EPEC adherence factor
⁶⁾ hämolytisch-urämisches Syndrom
⁹⁾ cytotoxic necrotizing factor
³⁾ hitzelabiles Enterotoxin
⁷⁾ thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
¹⁰⁾ cytolethal distending toxin
⁴⁾ hitzestabiles Enterotoxin

2.2.1 Verotoxin-bildende (VTEC)/Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC)

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) sind der Gruppe der Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) zugehörig und können beim Menschen folgenschwere Erkrankungen wie das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), die hämorrhagische Colitis (HC) und die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) hervorrufen (RKI und BGVV, 2001; BELL, 2002). Sie werden als die größte Herausforderung an die Lebensmittelindustrie seit dem Botulismus geschildert, wobei *E. coli* O157:H7 als das dominierende Pathogen dieser Gruppe gilt (BELL, 2002). Die Meldepflicht für Infektionen des Menschen mit EHEC ist in §7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) separat von der vorzunehmenden Meldung für „*Escherichia coli*, sonstige darmpathogene Stämme“ aufgeführt; ebenso sind Verdacht, Erkrankung und Tod durch HUS gemäß §6 des IfSG meldepflichtig (ANONYMOUS, 2000). Im Jahr 2007 kamen 839 EHEC-Erkrankungen (außer HUS), 44 HUS-Fälle und 6431 Erkrankungen durch „sonstige darmpathogene *E. coli*“ zur Meldung; im Jahr 2006 waren es dagegen 1179 EHEC-Erkrankungen (außer HUS), 63 HUS-Fälle und 6473 Erkrankungen durch „sonstige darmpathogene *E. coli*“ (RKI, 2008c). Ausführlicher wird dieses Pathovar in Kapitel 2.3 thematisiert.

2.2.2 Enteropathogene *E. coli* (EPEC)

Lange Zeit erfolgte die Definition der enteropathogenen *E. coli* (EPEC) gemäß bestimmten O-Serogruppen und später nach O:H-Serotypen. Auf dem „Second International Symposium on EPEC“ in São Paulo im Jahr 1995 wurde jedoch beschlossen, den EPEC alle *E. coli*-Stämme zuzuordnen, die typische „attaching and effacing“-Läsionen (A/E-Läsionen) hervorrufen, jedoch keine Verotoxine produzieren. Dieser Umstand unterscheidet sie von den VTEC, welche ebenfalls A/E-Läsionen in der Darmschleimhaut auslösen, jedoch zusätzlich das Verotoxin-Bildungsvermögen innehaben. Gekennzeichnet sind A/E-Läsionen durch die enge Adhärenz („attaching“) zwischen dem Bakterium und der Epithelzelle der intestinalen Schleimhaut und den Verlust der Mikrovilli („effacing“) (ref. in NATARO und KAPER, 1998). Die genetischen Determinanten der Pathogenitätsfaktoren, welche für die Ausbildung der A/E-Läsionen verantwortlich sind, liegen auf einer Pathogenitätsinsel, dem „locus of enterocyte effacement“ (LEE) (MC DANIEL et al., 1995). Zugehörig sind das äußere Membranprotein Intimin (codiert durch das „*E. coli* attaching and effacing“- (*eae*-) Gen),

Komponenten des Typ III-Sekretionssystems, der translozierte Intiminrezeptor Tir und einige sezernierende Proteine. Zusätzlich werden bei den EPEC „typische“ und „atypische“ Stämme unterschieden. Über ein EAF- (EPEC adherence factor-) Plasmid verfügende Stämme sind als „typische EPEC“ bzw. „class I“ zu klassifizieren, während Stämme ohne diesen weiteren Virulenzfaktor den „atypischen“ EPEC oder „class II“ zugeordnet werden. Im EAF-Plasmid sind Gene lokalisiert, welche für die „bundle forming pili“ codieren. Diese führen zum Zusammenschluss der Bakterien untereinander. Nicht abschließend geklärt ist, inwieweit sie auch für die Adhärenz der Erreger an die Epithelzellen des Darms verantwortlich sind (ref. in NATARO und KAPER, 1998).

An EPEC-Infektionen erkranken zumeist unter Zweijährige. Ältere Kinder und Erwachsene sind häufig symptomlos. Die Ursache hierfür ist nicht bekannt, eine These benennt jedoch den Verlust spezifischer Rezeptoren mit dem fortschreitenden Alter. Durch Immunsuppression oder durch Aufnahme enormer Inokula besteht dessen ungeachtet auch bei Erwachsenen die Möglichkeit der Erkrankung. Die Übertragung der EPEC erfolgt fäkal-oral. Kranke Kinder sowie asymptomatische Träger werden als Reservoir postuliert. In den 1940ern und 1950ern waren diese Erreger in den Industrienationen bei Ausbrüchen der Säuglings-Diarrhö von großer Bedeutung. Während die Bedeutsamkeit in diesem Zusammenhang in der Folgezeit abnahm, werden EPEC in den Entwicklungsländern weiterhin als eine der Hauptursachen der Diarrhö bei Kleinstkindern ausgewiesen. Bei einer durch EPEC, ebenso wie durch andere intestinale Erreger ausgelösten Erkrankung, sind die therapeutischen Angriffspunkte die Verhinderung einer Dehydratation und einer Elektrolytimbalanz. Zusätzlich kommen bei schwerem Verlauf antimikrobielle Wirkstoffe zum Einsatz, wobei jedoch vielfach Resistenzen bestehen. EPEC-Erkrankungen äußern sich in akuter wässriger Diarrhö, Erbrechen und geringgradigem Fieber. Histopathologisch lassen sich durch Biopsien häufig charakteristische A/E-Läsionen feststellen (ref. in NATARO und KAPER, 1998). In Deutschland machen EPEC seit mehreren Jahren den größten Anteil unter allen gemeldeten *E. coli*-Fällen mit Angabe des Pathovars aus (RKI 2005; RKI, 2006; RKI, 2007a). So entfielen auch im Jahr 2007 77,8 % der gemeldeten *E. coli*-Enteritiden (ohne EHEC) auf diese Gruppe (RKI, 2008c). Die bedeutendsten Serovare in diesem Land sind O26:H11, O86:H34 und O125:H19 (RKI, 1996a).

Wie bereits erwähnt, führen EPEC ebenso zu Erkrankungen bei Tieren und wenden dabei viele der Virulenzfaktoren an, die auch in humanen Stämmen vorkommen (KAPER et al., 2004). Als Reservoir der typischen EPEC wurde der Mensch charakterisiert; für atypische

Stämme sind neben humanen Individuen verschiedene Tiere zu nennen (ref. in TRABULSI et al., 2002). Untersuchungen von gesunden Rindern bewiesen eine Prävalenz von 8,2 %, wobei sich keine prägnanten Unterschiede in den Nachweisraten von Kälbern, Färsen und adulten Tieren ergaben. Bei den am frequentesten detektierten Serogruppen handelte es sich um O10, O26, O71, O145 und O156 (ORDEN et al., 2002). Die Bedeutung von EPEC für die Entwicklung einer Diarrhö gilt als fraglich (ORDEN et al., 2002). Studien taxierten im Kot von Kälbern mit Durchfall geringere Zahlen von EPEC als in Fäzes von gesunden Kälbern. Dagegen wurden in Betrieben mit Durchfallproblemen bei Kälbern mit Diarrhö höhere Keimzahlen ermittelt als bei nicht erkrankten Tieren (CHINA et al., 1998; HOLLAND et al., 1999). Bei Hunden wird auf eine eindeutige Korrelation zwischen EPEC und intestinalen Erkrankungen von Jungtieren hingewiesen (BEUTIN, 1999), und auch bei Kaninchen wird bestimmten EPEC-Stämmen eine Bedeutung bei Darmerkrankungen zugesprochen (MILON et al., 1999).

2.2.3 Enterotoxinogene *E. coli* (ETEC)

ETEC werden durch die Bildung hitzestabiler (ST) oder hitzelabiler (LT) Enterotoxine charakterisiert (LEVINE, 1987). Die hitzelabilen Toxine besitzen eine große Ähnlichkeit zu den Enterotoxinen von *Vibrio cholerae* (SIXMA et al., 1993) und lassen sich in LT-I und LT-II unterteilen. Während LT-I in Stämmen aufzufinden sind, die Erkrankungen bei Menschen und Tieren auslösen, verursachen Stämme mit LT-II keine klinischen Symptome, können jedoch ungeachtet dessen bei Tieren und selten auch bei Menschen detektiert werden. Auch die hitzestabilen Enterotoxine sind in zwei Gruppen eingeteilt, STa und STb. Die Gene für die ST und LT sind auf Plasmiden lokalisiert. Durch Bindung der Enterotoxine an Membranen der Wirtszellen werden Folgeaktionen ausgelöst, die letztendlich durch Phosphorylierung von Chloridkanälen in der osmotischen Diarrhö resultieren. Neben diesen Begebenheiten sind die Kolonisationsfaktoren von Bedeutung. Für die Anheftung der Erreger an die Epithelzellen der Darmschleimhaut sind Fimbrien verantwortlich, die zudem die Speziespezifität dieser Mikroorganismen ausmachen. Diese Virulenzfaktoren werden auf den gleichen Plasmiden codiert wie die Enterotoxine (ref. in NATARO und KAPER, 1998).

ETEC lösen hauptsächlich bei Kindern in Entwicklungsländern „choleraähnliche“ Diarrhöen aus und sind von Relevanz bei der sogenannten „Reisediarrhö“ (RKI, 1996a; NATARO und KAPER, 1998). Als Hauptursache für ETEC-Infektionen in diesen Regionen wird die

Aufnahme fäkal kontaminierter Lebensmittel einschließlich verunreinigten Trinkwassers beschrieben. Durch die zunehmende Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen und aufgrund der schlechten Verfügbarkeit von bei Kindern einsetzbaren Antibiotika in Entwicklungsländern, ist allein der orale Flüssigkeitsersatz für Kinder häufig lebensrettend. Ebenso ist die Rehydratation für Reisende beim Auftreten von Diarrhö von großer Bedeutung (ref. in NATARO und KAPER, 1998). Die Gruppe der ETEC macht in Deutschland unter den gemeldeten *E. coli*-Fällen (ohne EHEC) im Jahr 2007 mit 3,4 % den zweitgrößten Anteil aus (RKI, 2008c). Bedeutsame Serotypen in Deutschland beim Menschen sind O78:H12 und O8:H37; ähnliche Serovare werden auch bei Tieren dokumentiert (RKI, 1996a). Diese bei Tieren vorkommenden Stämme exprimieren jedoch andere Kolonisationsfaktoren als beim Menschen (KAPER et al., 2004), weshalb davon ausgegangen wird, dass Stämme animalen Ursprungs keine humanen Erkrankungen auslösen (ref. in NATARO und KAPER, 1998). ETEC verursachen bei Jungtieren (Kälber, Lämmer und Ferkel) in den ersten Lebenstagen häufig die sogenannte Colidiarrhö und können durch starke Exsikkose zum Tod führen (ROLLE und MAYR, 2002); bei Hunden und Katzen ist diese Gruppe dagegen wenig verbreitet. Die Therapie besteht auch bei Tieren aus oraler bzw. intravenöser Rehydratation und der Verabreichung von Antibiotika (NAGY und FEKETE, 1999).

2.2.4 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

EIEC weisen in ihrer Biochemie, Genetik und Pathogenetik große Ähnlichkeit mit *Shigella* ssp. auf. Beide Erreger zeichnen sich durch das Invasionsvermögen in die Epithelzellen des Colons aus; die hierfür codierenden Gene sind auf einem 140 MDa großen Plasmid lokalisiert. Ein mögliches Vorkommen von Enterotoxinen wird als Erklärung für das Auftreten der typischen wässrigen Diarrhö gesehen (ref. in NATARO und KAPER, 1998), wobei teilweise auch Blut und Schleim enthalten ist (GROSS et al., 1983). Erkrankungen mit diesem Mikroorganismus sind in der Aufnahme von verunreinigtem Trinkwasser und kontaminierten Lebensmitteln begründet, wobei auch Berichte von Mensch zu Mensch-Übertragungen vorliegen (ref. in NATARO und KAPER, 1998). Als bedeutende Serovare in Deutschland werden O124:H⁻, O148:H⁻ und O164:H⁻ aufgeführt (RKI, 1996a). Lediglich 0,8 % aller gemeldeten *E. coli*-Fälle (ohne EHEC) mit Pathovarangabe entfallen im Jahr 2007 auf EIEC (RKI, 2008c). Diese geringe Inzidenz war auch schon in den vorangegangenen Jahren zu verzeichnen (RKI, 2006; RKI, 2007a).

2.2.5 Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC)

EAggEC vermögen Hämolysine und Zytotoxine, ein dem hitzestabilen Enterotoxin von ETEC ähnliches Enterotoxin sowie verschiedenartige Fimbrien und äußere Membranproteine zu bilden. Die Gruppe zeichnet sich durch die aggregative Adhärenz an Hep-2-Zellen (Zellen einer humanen Larynx-Epithelium-Zelllinie) aus. Die Adhäsine AAF/I und AAF/II (aggregative adherence fimbriae I und II) sind lediglich in wenigen Stämmen nachzuweisen (LAW und CHART, 1998; NATARO et al., 1998), ebenso wie AAF III (BERNIER et al., 2002). Nur etwa 40 % der EAggEC bilden das Enterotoxin AST 1 (EAggEC heat-stable enterotoxin 1), welches auch bei EPEC, ETEC und VTEC beschrieben wird (SAVARINO et al., 1993; SAVARINO et al., 1996). EAggEC adhäreren an der intestinalen Schleimhaut und regen die Schleimproduktion an, woraufhin sich ein dichter Mukus-Biofilm mit den enthaltenen Erregern bildet. Dies begünstigt eine andauernde Besiedelung mit den Bakterien und eine Malabsorption. Die Bildung von Zytotoxinen sowie das Auftreten von Entzündungsreaktionen werden als Begründung für die Schädigung der Schleimhaut und der intestinalen Sekretion in Betracht gezogen (NATARO et al., 1998). Die Ursache für die Auslösung persistenter Diarrhöen ist noch nicht hinreichend geklärt (WEINTRAUB, 2007). In Entwicklungsländern wird dieser Gruppe aufgrund des häufig langwierigen, teilweise über zwei Wochen andauernden Durchfalls bei Kindern und der möglichen Todesfolge große Bedeutung beigemessen. Jedoch waren diese Erreger auch bei durch Lebensmittel ausgelösten Ausbrüchen in Industrieländern nachweisbar (ref. in NATARO et al., 1998). Klinische Symptome bestehen in akuten, aber auch chronischen Durchfällen, wobei überwiegend Kinder betroffen sind (HUPPERTZ et al., 1997). EAggEC sind ebenfalls als Ursache für Diarrhöen bei Erwachsenen zu verzeichnen und werden auch im Zusammenhang mit persistenten Durchfall-Erkrankungen bei HIV- (Humanes Immundefizienz-Virus) Infizierten genannt (BERNIER et al., 2002). Zudem wurde dieses Pathovar als wichtiger Auslöser für die Reisediarrhö postuliert (ADACHI et al., 2001). Für das Ausmaß der Erkrankung spielen das Alter sowie der Ernährungs- und Immunstatus eine Rolle, wobei zusätzlich die These besteht, dass nur gewisse Stämme Erkrankungen auslösen können (LAW und CHART, 1998).

Resistenzhebungen zeigten eine Unempfindlichkeit der Erreger gegen fünf von neun getesteten Antibiotika (SANG et al., 1997). In Deutschland entfielen im Jahr 2007 1,1 % aller gemeldeten *E. coli*-Fälle (ohne EHEC) mit Pathovarangabe auf EAggEC (RKI, 2008c).

2.2.6 Diffus-adhärenente *E. coli* (DAEC)

DAEC zeichnen sich durch ihr charakteristisches und diffuses Anheftungsmuster an Hep-2-Zellen aus und gelten als Auslöser wässriger Durchfälle bei über einjährigen Kindern (ref. in NATARO und KAPER, 1998). In Deutschland machten DAEC im Jahr 2007 unter den nach IfSG gemeldeten *E. coli*-Fällen (ohne EHEC) mit Angabe der Pathogruppe 0,1 % aus (RKI, 2008c). Empfindlichkeitstestungen mit 112 Stämmen dieser Gruppe ergaben gegenüber sechs der getesteten Antibiotika eine Resistenz von über 50 %. Lediglich zwei der Stämme erwiesen sich als sensibel. Die Gene für die diffuse Adhärenz und die Antibiotikaresistenz liegen auf denselben konjugativen Plasmiden. Dieser Umstand scheint für die Epidemiologie von Bedeutung zu sein (LOPES et al., 2005).

2.2.7 Nekrotoxische *E. coli* (NTEC)

NTEC werden durch die Bildung von CNF („cytotoxic necrotizing factor“) charakterisiert. Durch diesen Faktor kommt es zu nekrotisierenden Veränderungen an der Haut von Kaninchen und zu auffallenden morphologischen Veränderungen in epithelialen Zelllinien (CHO-, Vero- und HeLa-Zellen) (CAPRIOLI et al., 1983). Aufgrund der unterschiedlichen ausgelösten Zellveränderungen werden CNF-1 (NTEC-1) und CNF-2 (NTEC-2) unterschieden; beide Typen sind mit verschiedenen Virulenzfaktoren assoziiert. Bei einigen Stämmen lassen sich Hämolysine und CDT („cytolethal distending toxins“) identifizieren. Die Kombination dieser Virulenzfaktoren vermag eine enorme Pathogenität zu verursachen. Beim Menschen löst diese Gruppe überwiegend extraintestinale Erkrankungen aus (ref. in DE RYCKE et al., 1999), wobei sie jedoch ebenso in Verbindung mit Ausbrüchen neonataler Diarrhö geschildert wird (BLANCO et al., 1992). NTEC-1 kommen bei Menschen und Haustieren vor, wohingegen von NTEC-2 einzig bei Wiederkäuern berichtet wird (DE RYCKE et al., 1999). Bei Kälbern gelten NTEC als Auslöser von Diarrhö und Septikämie (OSWALD et al., 1991; ORDEN et al., 1999), sie sind aber auch bei gesunden Tieren detektierbar. Aufgrund dessen gelten Rinder als Reservoir für NTEC (ORDEN et al., 2002). In Lebensmitteln wird diese Gruppe nur selten ermittelt (QUINTO und CEPEDA, 1996).

2.2.8 Cytolethal distending toxin-producing *E. coli* (CLDTEC)

„Cytolethal distending toxins“ (CDT) bewirken bei verschiedenen Zelllinien (CHO-, Vero-, HeLa- und Hep-2-Zellen) durch die irreversible Blockade des Zellzyklus in der G₂-Phase vor der Mitose eine Zell-Vergrößerung und den Tod der Zellen (JOHNSON und LIOR, 1988; COMAYRAS et al., 1997). Sie bestehen aus den drei Untereinheiten CDTA, CDTB und CDTC (OHARA et al., 2004) und werden durch drei nebeneinander liegende Gene (*cdtA*, *cdtB* und *cdtC*) codiert. Diese Toxine wurden bei vielen gramnegativen Bakterien, die für ihre Schleimhaut-Pathogenität bei Menschen und Tieren bekannt sind, nachgewiesen (neben *E. coli* und *Shigella dysenteriae*, auch bei verschiedenen *Campylobacter*- und *Helicobacter*-Spezies, *Actinobacillus actinomycetem-comitans* und *Haemophilus ducreyi*) (ref. in DE RYCKE und OSWALD, 2001). CDT-produzierende *E. coli* waren bei Kindern mit und ohne Diarrhö-Erkrankung aufzufinden, weshalb sie als Auslöser akuter Diarrhöen nicht abschließend bestätigt werden können (ALBERT et al., 1996; MARQUES et al., 2003).

2.2.9 Cell-detaching (CDEC)/Diarrhea-associated haemolytic *E. coli* (DHEC)

Die erste Beschreibung der Cell-detaching *E. coli* (CDEC) findet sich in einer Publikation von GUNZBURG et al. (1993). In dieser Arbeit waren die Assoziation dieser Stämme mit Kinder-Durchfall sowie die nachweisbare Abtrennung des Hep-2-Zellen Monolayers auffällig. In einer anderen Erhebung zu dieser Fragestellung war kein Zusammenhang dieser Gruppe zu Diarrhö-Erkrankungen bei Kindern darlegbar, wohingegen das Vermögen zur alpha-Hämolysin-Bildung festgestellt wurde. Dieser Befund unterscheidet die CDEC von anderen Pathogruppen wie DAEC und EPEC, die auch das Phänomen der Zell-Ablösung aufweisen (MARQUES et al., 1995). ELLIOTT et al. (1998a) benannten demzufolge diese Gruppe später als „diarrhoe-associated haemolytic *E. coli*“ (DHEC) und zeigten das Potential einiger Stämme zur Produktion von Pyelonephritis-assoziierten Pili, CNF-1 und anderen Toxinen auf.

In verschiedenen Studien wurden zahlreiche Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen und die Lokalisation der Resistenzgene auf mobilen genetischen Elementen nachgewiesen, weshalb diese Gruppe als mögliches Reservoir für Antibiotika-Resistenzgene in Betracht gezogen wird (ABDUCH FÁBREGA et al., 2002; OKEKE et al., 2002).

2.3 Nomenklatur und Pathogenitätsfaktoren von VTEC/EHEC

2.3.1 VTEC, EHEC und *E. coli* O157:H7

Die Gruppe der VTEC besitzen typischerweise das Potential, Verotoxine bilden zu können (BEUTIN, 1989; RKI, 2002; BÜLTE und GOLL, 2006; EFSA, 2007). KONOWALCHUK et al. (1977) entdeckten, dass einige *E. coli*-Stämme ein Toxin mit einem irreversiblen zytotoxischen Effekt auf Vero-Zellen produzieren und bezeichneten dieses als Verotoxin. O'BRIEN et al. wiesen im selben Jahr ein dem Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 sehr ähnliches Toxin bei EPEC-Stämmen nach und beschrieben es als Shiga-like-Toxin. Zu den untersuchten Stämmen gehörte ein von KONOWALCHUK et al. (1977) untersuchtes Isolat, bei welchem Verotoxinbildung nachgewiesen wurde (O'BRIEN et al., 1977). Die Untersuchungen der Nucleotid-Sequenz von Shiga-like-Toxin 1 durch CALDERWOOD et al. (1987) ergaben ebenfalls eine große Ähnlichkeit zu dem von *Shigella dysenteriae* produzierten Shiga-Toxin. Weitere Untersuchungen führten zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei Verotoxin und Shiga-like-Toxin um ein nahezu identisches Toxin handelt (O'BRIEN und LA VECK, 1983; O'BRIEN und HOLMES, 1987). Dementsprechend wurde entschieden, die Begriffe Verotoxin und Shiga-Toxin als Synonym verwenden zu können, ebenso die Bezeichnungen VTEC und STEC (ACHESON, 1998) und *vtx* bzw. *stx* als Benennungen der für die Toxine codierenden Gene (BÜLTE und GOLL, 2006). Das RKI verwendet zusätzlich die Nomenklatur **enterohämorrhagische *E. coli*** (EHEC) als Synonym für VTEC und STEC. Als EHEC im engeren Sinne werden VTEC bezeichnet, die beim Menschen zu akuter Enteritis, hämorrhagischer Colitis (HC) oder zu den lebensgefährlichen Erkrankungen hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) oder thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) führen können. Da es momentan jedoch an präzisen Unterscheidungsmöglichkeiten mangelt, werden alle vom Menschen isolierten (humanpathogenen) VTEC als EHEC definiert (RKI und BGVV, 2001; RKI, 2002; RKI 2008a), weshalb im Infektionsschutzgesetz vollumfänglich der Begriff EHEC vorzufinden ist (ANONYMOUS, 2000). Andere Autoren vertreten die Meinung, der Ausdruck EHEC sei lediglich auf Stämme zu beziehen, welche Verotoxine produzieren, A/E-Läsionen verursachen, ein 60-MDa-Plasmid besitzen sowie schwerwiegende Erkrankungen wie HC und HUS beim Menschen hervorrufen (LEVINE, 1987; TZIPORI et al., 1987). NATARO und KAPER (1998) bezeichnen Stämme mit den genannten Eigenschaften als „typische EHEC“ und Stämme, die keine A/E-Läsionen verursachen bzw. kein 60-MDa-Plasmid besitzen als „atypische EHEC“. BOCKEMÜHL und KARCH (1996) sind der Ansicht, dass die pathogenen *E. coli*-Stämme als EHEC zu definieren seien, welche Verotoxine bilden

und imstande sind, beim Menschen HC und HUS hervorzurufen. RICHTER et al. (1998) ebenso wie BUSCH et al. (2004) deklarieren alle VTEC als potentielle EHEC. BÜLTE dagegen ist der Auffassung, die Gruppe der EHEC müsse sich durch zusätzliche Pathogenitätsfaktoren (*eae*-Gen) sowie die Isolation von erkrankten Menschen auszeichnen. Die Annahme, jeder VTEC sei ein potentieller EHEC, könne demnach nicht weiter unterstützt werden (BÜLTE und HECKÖTTER, 1997; BÜLTE, 2001).

Als bedeutendster Serotyp unter den EHEC wird *E. coli* O157:H7 betrachtet (BELL, 2002). Diese Seroovar wurde erstmals im Jahr 1983 durch RILEY et al. thematisiert, welche zwei Ausbrüche in Oregon und Michigan untersuchten. Der Verzehr ungenügend erhitzter Hamburger aus Rindfleisch bei derselben Fast-Food-Kette führte damals bei 47 betroffenen Menschen zu starken Bauchschmerzen und -krämpfen, erst wässriger und später blutiger Diarrhö, während Fieber sehr selten auftrat bzw. gänzlich ausblieb (RILEY et al., 1983). Die Erkrankung wurde als Hämorrhagische Colitis (HC) bezeichnet (WELLS et al., 1983; NATARO und KAPER, 1998). Im selben Jahr stellten KARMALI et al. einen Zusammenhang zwischen Verotoxin-produzierenden *E. coli* in humanem Stuhl und vereinzelt Fällen der Erkrankung HUS dar (KARMALI et al., 1983). Heute wird die Serogruppe O157 weltweit am häufigsten nachgewiesen (RKI, 2008a). Das Risiko der Entstehung eines HUS bei infizierten Kindern durch non-O157:H7 ist nicht bekannt, da die Isolationsrate von non-O157:H7-Stämmen in menschlichem Stuhl gering ist. *E. coli* O157:H7 wird daher als hauptsächlicher Auslöser für HUS gesehen (TARR et al., 1997). Im Einklang mit dieser Ansicht weisen JELACIC et al. (2003) darauf hin, dass von non-O157:H7- seltener blutige Diarrhö ausgelöst wird als von O157:H7-Stämmen.

2.3.2 Verotoxine

KONOWALCHUK et al. (1977) bezeichneten das von VTEC gebildete Toxin mit einer zytopathogenen Auswirkung auf Vero-Zellen als Verotoxin, während die Arbeitsgruppe um O'BRIEN durch ihre Studien zu der Auffassung kam, dass es sich bei Verotoxin und Shiga-like-Toxin um ein nahezu identisches Toxin handelt (O'BRIEN und LA VECK, 1983; O'BRIEN und HOLMES, 1987). Die Bezeichnungen Verotoxin und Shiga-Toxin, ebenso wie VTEC und STEC sowie *vtx* und *stx*, sind - wie bereits erwähnt - synonym zu verwenden (ACHESON, 1998). So wird in dieser Arbeit die VTEC bzw. Verotoxin- (VT) Nomenklatur angewandt und

alle in den ursprünglichen Publikationen verwendeten Begriffe wie STEC oder Shiga-Toxin (Stx) bzw. Shiga-like-Toxin (SLT) vereinheitlicht.

Verotoxine lassen sich in die zwei Hauptgruppen VT 1 und VT 2 unterteilen, da eine serologische Kreuzneutralisation ausbleibt (SCOTLAND et al., 1985; STROCKBINE et al., 1986). Nur bei VT 1, nicht jedoch bei VT 2, kommt es zu einer Neutralisation durch Antiseren gegen das Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ I, da die Toxine VT 1 und Shiga-Toxin hochgradig ähnlich sind (STROCKBINE et al., 1986; STROCKBINE et al., 1988). So eruierten STROCKBINE et al. (1988), dass die Gene von VT 1 und Shiga-Toxin eine über 99 % ige Homologie aufweisen und sich die Aminosäuresequenz lediglich in einer Aminosäure unterscheidet. Dagegen verfügen VT 1 und VT 2 nur zu 58 % über gemeinsame Gensequenzen, und die Aminosäuresequenz stimmt lediglich zu 56 % überein (JACKSON et al., 1987). Die für Verotoxine codierenden Gene sind auf Bakteriophagen lokalisiert (STROCKBINE et al., 1986; STROCKBINE et al., 1988). Aufgrund dieser Tatsache sind die Toxingene auf andere Stämme übertragbar, so dass diese daraufhin ebenfalls zur Verotoxinproduktion befähigt sein können. Da von Patienten isolierte Verotoxinproduzierende Stämme ihre Toxingene während der Subkultivierung ebenso verlieren können, ist verständlich, dass das Toxinbildungsvermögen teilweise nicht mehr nachweisbar ist, obwohl die Erkrankung durch einen VT-bildenden Erreger ausgelöst wurde (KARCH et al., 1992; MELLMANN et al., 2005; BIELASZEWSKA et al., 2007).

Das Holotoxin besteht aus einer aktiven A-Untereinheit, die für die Hemmung der Proteinsynthese zuständig ist, und aus fünf B-Untereinheiten, die für die Bindung an die Rezeptoren der Zelloberflächen sorgen (DONOHUE-ROLFE et al., 1984; O'BRIEN und HOLMES, 1987). Zur Bindung der Verotoxine dient hauptsächlich der Glycolipid-Rezeptor Globotriosylceramid (Gb₃) der eukaryotischen Zellen (LINGWOOD et al., 1987; WADDELL et al., 1988). Die Hauptvarianten VT 1 und VT 2 werden aufgrund ihrer Unterschiedlichkeit in Subtypen unterteilt. Eine detaillierte Zusammenstellung der Toxinvarianten fand durch BÜLTE und GOLL (2006) statt und ist in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt.

In ersterer Gruppe wurde zunächst nur das VT 1 benannt (STROCKBINE et al., 1986). Während ZHANG et al. im Jahr 2002 über VT 1c berichteten, welches sie bei humanen Stämmen detektierten, konnten im folgenden Jahr BÜRK et al. (2003) den Typ VT 1d sowie OHMURA-HOSHINO et al. (2003) die Varianten VT 1v51 und VT 1v52 in Stämmen aus Rindermatrizes

ermitteln. Andere Autoren beschreiben zudem eine VT 1-Variante mit einem IS1203-ähnlichen Element (IS1203_{v1}) (SUZUKI et al., 2004).

Tabelle 2: VT 1-Varianten bei *E. coli*-Stämmen

(in Anlehnung an BÜLTE und GOLL, 2006)

Toxin-Variante	Nukleotidsequenz-homologie zu <i>vtx1</i>		Quelle	Bemerkungen
	A ¹⁾	B ¹⁾		
VT 1 ²⁾	100 %	100 %	SCOTLAND et al., 1985 STROCKBINE et al., 1986	
VT 1c	95 %		ZHANG et al., 2002	identisch mit VT 1-OX3 nach PATON et al., 1995
VT 1d	91 %		BÜRK et al., 2003	Aminosäuresequenz identisch mit VT 1v51 und VT 1v52 nach OHMURA-HOSHINO et al., 2003
VT 1v51, VT 1v52	k.A. ³⁾ (94 % AS)	k.A. (92 % AS)	OHMURA-HOSHINO et al., 2003	Aminosäuresequenz von VT 1v51 und VT 1v52 identisch; identisch mit VT 1d nach BÜRK et al., 2003
VT1-Variante mit IS1203 _{v1}	k.A.		SUZUKI et al., 2004	IS1203-ähnliches Element in A-Untereinheit

¹⁾ Sequenzen, die für die A- bzw. B-Untereinheit codieren

²⁾ Verotoxin (VT)-Nomenklatur einheitlich angewandt

³⁾ keine Angabe

% AS: Aminosäuresequenz-Homologie

In der Hauptgruppe VT 2 wurde zunächst das von STROCKBINE et al. (1986) genannte VT 2 bekannt. Darauf folgend wiesen ITO et al. im Jahr 1990 den Subtyp VT 2vh in einem von einem HUS-Patienten kultivierten Stamm nach und gliederten nochmals in die Untergruppen VT 2vh-a und VT 2vh-b. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden diese Varianten in VT 2d1 und VT 2d2 umbenannt (MELTON-CELSA et al., 1998; KOKAI-KUN et al., 2000). In der Arbeit von MEYER et al. (1992) erfolgte eine Beschreibung der Variante VT 2vhc. Andere Autoren berichteten wiederum von den Untergruppen VT 2c (SCHMITT et al., 1991) und VT 2d, wobei letztere die Toxintypen VT 2d-Ount, VT-2d-OX3a und VT 2d-O111 beinhaltet (PIÉRARD et al., 1998) und nicht mit der von KOKAI-KUN et al. (2000) beschriebenen Gruppe übereinstimmt. Von WEINSTEIN wurde der Typ VT 2e, welcher bei Schweinen die Ödemkrankheit auslöst, als VT 2v deklariert (MARQUES et al., 1987; WEINSTEIN et al., 1988). Während diese Arbeitsgruppe bei dem genannten Typ keine Toxin-codierenden Sequenzen auf Bakteriophagen ermitteln konnte und daher von einer chromosomalen Codierung ausging (WEINSTEIN et al., 1988), war es MUNIESA et al. (2000) allerdings möglich, einen VT 2e übertragenden Bakteriophagen bei einem VT 2e-produzierenden Stamm darzustellen. Die genannte Untergruppe bindet zudem nicht wie die anderen VT-Subtypen an den Gb₃-Rezeptor, sondern an den Globotetraosylceramid- (Gb₄) Rezeptor (DE GRANDIS et al., 1989). Von weiteren Toxinvarianten (VT 2f) berichteten SCHMIDT et al. (2000) in von Tauben isolierten Stämmen und zusätzlich LEUNG et al. (2003) in aus Rindermatrizes kultivierten VTEC (VT 2g). Zudem fand durch BERTIN et al. (2001) eine Beschreibung des Subtyps VT 2-NV206 statt. Eine Auflistung dieser Varianten ist in Tabelle 3 zu finden.

Tabelle 3: VT 2-Varianten bei *E. coli*-Stämmen

(in Anlehnung an BÜLTE und GOLL, 2006)

Toxin-Variante	Nukleotidsequenz-homologie zu <i>vtx2</i>		Quelle	Bemerkungen
	A ¹⁾	B ¹⁾		
VT 2 ²⁾	100 %	100 %	STROCKBINE et al., 1986	
VT 2vh (VT 2vh-a, VT 2vh-b)	98,6 % ³⁾	95,5 % ³⁾	ITO et al., 1990	Reklassifizierung zu VT 2c nach WHO, 1991; Umbenennung in VT 2d (VT 2d1, VT 2d2) nach MELTON-CELSA et al., 1998
VT 2vh	99,0 %	95,0 %	MEYER et al., 1992	
VT 2va	69,5 %	78,1 %	GANNON et al., 1990	Vorschlag von SCHMIDT et al., 2000: Reklassifizierung in VT 2f
VT 2c	99,7 %	95,2 %	SCHMITT et al., 1991	Berücksichtigung von VT 2vh-a und VT 2vh-b, gemäß WHO, 1991
VT 2e	94,0 %	79,0 %	WEINSTEIN et al., 1988	ursprünglich VT 2v
VT 2d (VT 2d1, VT 2d2)	(siehe VT 2vh)		MELTON-CELSA et al., 1998	nicht identisch mit VT 2d nach PIÉRARD et al., 1998; identisch mit VT 2vh (VT 2vh-a, VT 2vh-b) nach ITO et al., 1990
VT 2d (VT 2d-Ount, VT 2d-O111, VT 2d-OX3a)	94,9 % ⁴⁾	86,6 % ⁴⁾	PIÉRARD et al., 1998	nicht identisch mit VT 2d nach MELTON-CELSA et al., 1998
VT 2f	63,4 %	75,4 % ⁵⁾	SCHMIDT et al., 2000	Berücksichtigung von VT 2a
VT 2g	k.A. ⁶⁾ (63,0-94,9 %) ⁷⁾	k.A. (76,7-90,7 %) ⁷⁾	LEUNG et al., 2003	
VT 2-NV206	k.A. (94,5-99,0 %) ⁷⁾	k.A. (81,5-96,0 %) ⁷⁾	BERTIN et al., 2001	

¹⁾ Sequenzen, die für die A- bzw. B-Untereinheit codieren²⁾ Verotoxin-Nomenklatur einheitlich angewandt³⁾ bezogen auf VT 2vh-a⁴⁾ nach FRIEDRICH et al., 2002⁵⁾ nach FRIEDRICH et al., 2002 (SCHMIDT et al., 2000: 57,4 %)⁶⁾ keine Angabe⁷⁾ bezogen auf VT 2 und VT 2-Varianten

2.3.3 Weitere Virulenzfaktoren

Neben den Verotoxinen sind bei den VTEC noch die fünf bislang beschriebenen Pathogenitätsinseln zu erwähnen, die für verschiedene Pathogenitätsfaktoren codieren und von denen der „**locus of enterocyte effacement**“ (**LEE**) am häufigsten benannt und am besten untersucht wurde. Unter dem Begriff der „Pathogenitätsinsel“ sind auf Chromosomen lokalisierte DNA-Abschnitte zu verstehen, auf denen für Virulenzfaktoren codierende Gene verankert sind. Diese unterscheiden sich beispielsweise von den anderen Genabschnitten durch den G- und C-Anteil und die Codon-Verwendung, zudem sind deren Grenzen durch sich wiederholende Sequenzen oder Insertions-Elemente gekennzeichnet. Daher wird geschlussfolgert, dass diese DNA-Abschnitte einen fremden Ursprung aufweisen. Darüber hinaus sind diese Gensequenzen in nahe verwandten, avirulenten Bakterien größtenteils nicht aufzufinden. Durch den Transfer dieser Pathogenitätsinseln können Bakterien innerhalb eines Übertragungsvorgangs komplexe Virulenzmerkmale erlangen (ref. in MECSAS und STRAUSS, 1996; BÜLTE und GOLL, 2006), wobei auch die Weitergabe einzelner Gene für möglich gehalten wird (SCHMIDT et al., 2001; BÜLTE und GOLL, 2006). Die Pathogenitätsinsel LEE codiert für Virulenzfaktoren, die zu den sogenannten „attaching and effacing“ (A/E)-Läsionen führen (MOON et al., 1983; MC DANIEL et al., 1995). Diese sind, wie bereits erwähnt, durch den Verlust der Mikrovilli („effacing“) und durch die enge Adhärenz („attaching“) zwischen dem Bakterium und der Epithelzelle der intestinalen Schleimhaut gekennzeichnet (NATARO und KAPER, 1998). Zusätzlich entstehen deutliche Veränderungen am Zytoskelett der Wirtszelle (PERNA et al., 1998). Alle *E. coli*-Stämme, die eine Ausbildung von A/E-Läsionen verursachen, werden als AEEC („attaching effacing *E. coli*“) bezeichnet (MOON et al., 1983). Der LEE ist bei den EHEC nicht obligat vorhanden, wie es bei den EPEC der Fall ist, dennoch ist er bei klinischen Stämmen häufig vorzufinden (BÜLTE und GOLL, 2006).

Von den auf dem LEE liegenden Genen ist das ***eae*- (*E. coli* attaching and effacing) Gen** am längsten bekannt (BÜLTE und GOLL, 2006). Es codiert für das äußere Membranprotein **Intimin**, welches für die enge Adhärenz zwischen Bakterium und Wirtszelle verantwortlich ist. In vielen verschiedenen Versuchen wurden Intimin-Subtypen und Untergruppen differenziert, so dass inzwischen 18 Intimin-Subtypen (alpha bis sigma) geläufig sind, die teilweise noch weiter untergliedert werden (BÜLTE und GOLL, 2006; SCHÖNENBRÜCHER, 2006). Die drei Gene *espA*, *espB* und *espD* codieren für Sekretionsproteine (**EspA, EspB und EspD**), die in Signaltransduktionswege der Wirtszellen eingebunden sind, und die *esc*- bzw.

sep-Gene codieren für Komponenten des **Typ III-Sekretionssystems (TTSS)**. TTSS lassen sich in human-, tier- und pflanzenpathogenen gramnegativen Mikroorganismen ermitteln. Sie bestehen aus über 20 Proteinen, welche einen durch die Bakterien- und Wirtszellmembran reichenden Kanal bilden, so dass es den Bakterien ermöglicht wird, die biochemischen Zellgrenzen zu überwinden und somit Virulenzfaktoren aus dem bakteriellen Zytoplasma direkt in die betroffene Wirtszelle einzubringen. Es werden Effektorproteine, die in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangen und dort ihre Funktion ausüben, und Translokationsproteine, welche den Transport vermitteln, unterschieden. Als Prototyp gilt das TTSS von *Yersinia*-Spezies. Das am anderen Ende des LEE lokalisierte *tir*-Gen codiert für das **Effektorprotein Tir** (translocated intimin receptor). Dieses wiederum wird vom Bakterium über das TTSS in die Wirtszelle transloziert und fungiert dort als Rezeptor für das Membranprotein Intimin (DONNENBERG et al., 1993; JARVIS et al., 1995; KENNY und FINLAY, 1995; JARVIS und KAPER, 1996; KENNY et al., 1996; KENNY et al., 1997; LAI et al., 1997; ELLIOTT et al., 1998b; PERNA et al., 1998; CORNELIS und VAN GIJSEGM, 2000; GAUTHIER und FINLAY, 2002).

E. coli-Stämme vermögen verschiedene **Hämolysin-Typen** zu produzieren, von denen das α -Hämolysin funktionell, biochemisch und genetisch am besten charakterisiert wurde und mit extraintestinalen Erkrankungen assoziiert ist. Bei EPEC-Stämmen der Gruppen O26 und O111 ließ sich ein neues Hämolysin nachweisen, welches sich von α -Hämolysin morphologisch, immunologisch und genetisch unterschied und daraufhin als **Enterohämolysin** bezeichnet wurde (BEUTIN et al., 1988). Andere Autoren benannten dieses Hämolysin aufgrund des häufigen Vorkommens bei EHEC-Stämmen als EHEC-Hämolysin (SCHMIDT et al., 1995; SCHMIDT und KARCH, 1996; BOERLIN et al., 1999). BEUTIN et al. stellten zwischen dem Vorkommen von Enterohämolysin und der Verotoxin-Produktion eine Assoziation von 89 % fest. Der weiterhin nachgewiesene Zusammenhang zwischen der Enterohämolysin-Produktion und Durchfall-Erkrankungen könnte auf eine Funktion als Virulenzfaktor hindeuten (BEUTIN et al., 1988; BEUTIN et al., 1989). Gemäß anderer Literaturstellen herrscht im Gegensatz dazu die Ansicht, experimentelle Beweise für die Virulenz von Enterohämolysin fehlten noch, weshalb dieses nur als vermeintlicher Virulenzfaktor zu sehen sei (BOERLIN et al., 1999). Weitere Untersuchungen sehen aufgrund des hohen Vorkommens in EHEC-Stämmen einen möglichen Zusammenhang zwischen Enterohämolysin- und Verotoxin-Bildungsvermögen und der Pathogenese von HC und HUS (SCHMIDT et al., 1995). Bei der Untersuchung von VTEC O111-Stämmen ergab sich ein

deutlicher Unterschied zwischen HUS- und Diarrhö-Isolaten. So erwiesen sich 88 % der Stämme von HUS-Patienten, jedoch lediglich 22,2 % der Isolate von Durchfall-Patienten als Enterohämolysin-positiv (SCHMIDT und KARCH, 1996). BÜLTE (2001) stellte darüber hinaus in seiner Arbeit bei 90 % der Stämme von HUS- oder HC-Patienten, aber auch bei 93,4 % der Stämme von humanen Ausscheidern das Enterohämolysin dar. Hingegen erwiesen sich lediglich 57,5 % der aus Lebensmitteln kultivierten VTEC-Stämme als positiv. Mithilfe dieser Ausführungen sollen die teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnisse und Ansichten aufgezeigt werden.

2.4 Epidemiologische Situation von VTEC

2.4.1 Vorkommen bei Tieren

VTEC werden bei verschiedenen, in der Umgebung des Menschen vorkommenden Tierarten nachgewiesen und gelten als potentielle EHEC für den Menschen (RKI, 1996b). BEUTIN et al. (1993) wiesen bei 208 von insgesamt 720 gesunden Tieren VTEC nach. Dabei wurden diese Erreger am häufigsten bei Schafen (66,6 %), jedoch auch bei Ziegen (56,1 %), Rindern (21,1 %), Katzen (13,8 %), Schweinen (7,5 %) und Hunden (4,8 %) verzeichnet. Lediglich in Kotproben von Hühnern waren VTEC nicht nachzuweisen. Die Untersuchung von 516 gesunden und kranken Tieren ergab für 32 % der Schweine, 20 % der Schafe, 5 % der Rinder und 4 % der Hunde einen positiven VTEC-Befund. Bei 29 untersuchten Katzen waren diese Erreger dagegen nicht vorhanden (GALLIEN et al., 1994). Aufgrund solcher Ergebnisse ist zu schließen, dass VTEC im Kot vieler Tiere vorkommen, welche selbst nicht erkranken und so als symptomlose Ausscheider fungieren (BEUTIN et al., 1993; BEUTIN et al., 1994; EFSA, 2007).

2.4.1.1 Hauswiederkäuer

Rinder, aber auch Schafe und Ziegen werden als wichtigstes natürliches **Reservoir** der VTEC angesehen und stellen die primäre Infektionsquelle für den Menschen dar (WIELER et al., 1992; BEUTIN et al., 1993; CHAPMAN et al., 1993; BEUTIN et al., 1994; GALLIEN et al., 1994; HEUVELINK et al., 1998a; BÜLTE, 2002; ORDEN et al., 2002; BÜLTE, 2004; CAPRIOLI et al.,

2005; EFSA, 2007). Im Kot gesunder Kälber und adulter Tiere werden diese pathogenen Erreger häufig detektiert, ebenso aber auch bei Neugeborenen und bis zu vier Monate alten Kälbern mit intestinalen Erkrankungen (MAINIL, 1999). So fanden WANI et al. (2003) bei 11 von 391 an Diarrhö erkrankten Kälbern und bei einem von 101 durchfallkranken Lämmern VTEC, und auch WIELER et al. (1992) war es möglich, bei 21,9 % der untersuchten durchfallkranken Kälber und bei 12,9 % der gesunden Jungtiere VTEC nachzuweisen. Auffällig war die häufigere Detektion von VT 1 (17,8 %) bei kranken Tieren im Gegensatz zu gesunden Tieren (5,0 %), während VT 2 zahlreicher bei gesunden (8,9 %) als bei an Diarrhö erkrankten Tieren (4,1 %) feststellbar war. Dies ließ auf eine größere Bedeutung von VT 1-produzierenden *E. coli* bei Kälberdurchfall schließen. Entgegen dieser Resultate wurden in einer ebenfalls auf dieser Fragestellung beruhenden Studie häufiger VT 2 (3,4 %) als VT 1 (1,7 %) bei kranken Kälbern gefunden (GALLIEN et al., 1994). Im Kot anderer domestizierter Hauswiederkäuer und auch bei Wildwiederkäuern sind diese Erreger ebenfalls (nachfolgend in Kapitel 2.4.1.2 thematisiert) nachweisbar (BEUTIN et al., 1993; HEUVELINK et al., 1998a; THOMS, 1999).

Aus Kot und Lebensmitteln von Wiederkäuern isolierte VTEC-Stämme sind bereits über 300 unterschiedlichen Serotypen zugehörig. Als eine wesentliche Ursache hierfür gilt die Lokalisation der Verotoxingene auf Bakteriophagen, was eine einfache Weitergabe dieser Gene innerhalb der *E. coli*-Populationen ermöglicht (BÜLTE, 2002). Ungeachtet dessen lassen Erhebungen auf eine Wirtsspezifität bestimmter VTEC-Serotypen schließen (BLANCO et al., 2003). Im Gegensatz hierzu besteht die Möglichkeit der einfachen Übertragung für das „*eae*“-Gen aufgrund der chromosomalen Codierung nicht; die sogenannten „klassischen“, das „*eae*“-Gen innehabenden EHEC-Serovare sind relativ selten bei Wiederkäuern zu verzeichnen (BÜLTE, 2002). In Übereinstimmung dazu wird berichtet, dass *eae*-Gen positive non-O157 VTEC-Stämme seltener bei Rindern (17 %) und Schafen (5 %) als beim Menschen (45 %) gefunden werden. Daraus folgt, dass das *eae*-Gen signifikant zu der Virulenz humaner VTEC-Stämme beisteuert, und viele animale VTEC-Stämme von geringer Pathogenität für den Menschen sind (BLANCO et al., 1996; BLANCO et al., 2003). Studien aus unterschiedlichen Ländern belegen regelmäßig das **Vorkommen** von VTEC-Stämmen bei großen und kleinen Wiederkäuern (Tabellen 4, 5 und 6).

Tabelle 4: Nachweis von VTEC bei Wiederkäuern in Deutschland

Tierart	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
		VTEC allgemein	VTEC O157	
Milchkühe	82	10 (12,2)	k.A. ¹⁾	BÜLTE et al., 1990
Mastrinder	212	20 (9,4)	k.A.	
Rinder	142	30 (21,1)	0	BEUTIN et al., 1993
Schafe	120	80 (66,6)	0	
Ziegen	66	37 (56,1)	0	
Kälber (krank)	119	7 (5,9)	k.A.	GALLIEN et al., 1994
Schafe	15	3 (20,0)	k.A.	
Schlachtrinder	204	97 (47,6)	0	RICHTER et al., 1997
Rinder	533	82 (15,4)	15 (2,8)	BÜLTE, 2002
Schafe	131	53 (40,5)	0	

¹⁾ keine Angabe

Tabelle 5: Nachweis von VTEC bei Wiederkäuern in Europa

Land	Tierart	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	VTEC O157	
CH ¹⁾	Fleischrinder	544 ²⁾	76 (14,0) ³⁾	k.A. ⁴⁾	STEPHAN et al., 2000
	Schafe	140 ²⁾	41 (29,2) ³⁾	k.A.	
F ⁵⁾	Schlachtrinder	471	162 (34,4)	1 (0,2)	PRADEL et al., 2000
GB ⁶⁾	Fleischrinder	14856	k.A.	1231 (8,3)	GUNN et al., 2007
GB ⁷⁾	Schlachtrinder	2553	k.A.	121 (4,7)	MILNES et al., 2008
	Schafe	2825	k.A.	21 (0,7)	
E ⁸⁾	Kälber	101	8 (7,9)	k.A.	ORDEN et al., 2002
	Färsen	114	23 (20,2)	k.A.	
	adulte Rinder	197	5 (2,5)	k.A.	
	Lämmer	1300	467 (35,9)	5 (0,4)	BLANCO et al., 2003
I ⁹⁾	Schlachtrinder	100	k.A.	17 (17,0)	BONARDI et al., 2001
	Rinder	145	16 (11,0)	8 (5,3)	BONARDI et al., 2004
	Rinder	182	k.A.	6 (3,3)	BONARDI et al., 2007
IRL ¹⁰⁾	Schlachtrinder	220	k.A.	2 (0,9)	MADDEN et al., 2007
N ¹¹⁾	Rinder	1541	k.A.	3 (0,2)	JOHNSSEN et al., 2001
	Schafe	665	k.A.	0	
NL ¹²⁾	Schlachtrinder	540	k.A.	57 (10,6)	HEUVELINK et al., 1998a
	Kälber	397	k.A.	2 (0,5)	
	Mutterschafe	52	k.A.	2 (3,8)	
	Lämmer	49	k.A.	2 (4,1)	

¹⁾ Schweiz²⁾ fäkale Tupferproben³⁾ nach Anreicherung⁴⁾ keine Angabe⁵⁾ Frankreich⁶⁾ Großbritannien (Schottland)⁷⁾ Großbritannien⁸⁾ Spanien⁹⁾ Italien¹⁰⁾ Irland¹¹⁾ Norwegen¹²⁾ Niederlande

Tabelle 6: Nachweis von VTEC bei Wiederkäuern außerhalb Europas

Land	Tierart	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	VTEC O157	
BR ¹⁾	Rinder	153	39 (25,5)	k.A. ²⁾	IRINO et al., 2005
CN ³⁾	Rinder	176	k.A.	3 (1,7)	ZHOU et al., 2002
J ⁴⁾	Kühe	183	127 (69,4)	1 (0,5)	KOBAYASHI et al., 2001
	Färsen	88	58 (65,9)	0	
	Kälber	87	40 (46,0)	0	
	Schlachtrinder	605	97 (16,0)	k.A.	FUKUSHIMA und SEKI, 2004
USA ⁵⁾	Färsen	12664	k.A.	179 (1,4)	HANCOCK et al., 1997a
	Rinder	11881	k.A.	210 (1,8)	HANCOCK et al., 1997b
	Milchkühe (Farm)	205	k.A.	7 (3,4)	RICE et al., 1997
	Milchkühe (Schlachthof)	103	k.A.	4 (3,9)	
	Rinder	103	19 (18,4)	k.A.	SAMADPOUR et al., 2002

¹⁾ Brasilien²⁾ keine Angabe³⁾ China⁴⁾ Japan⁵⁾ Vereinigte Staaten von Amerika

Meist beruhen die Angaben auf Untersuchungen von Fäzes, da es sich um intestinale Erreger handelt. Bei den Prävalenzangaben ist zu bedenken, dass VTEC nicht kontinuierlich ausgeschieden werden und somit nicht zu jeder Zeit nachzuweisen sind (BÜLTE und HECKÖTTER, 1997; BÜLTE, 2004). Darüber hinaus sind die hervorgehenden inhomogenen VTEC-Häufigkeiten teilweise mit methodischen Unterschieden zu erläutern (ARMSTRONG et al., 1996; RICHTER et al., 1997).

BÜLTE (2004) bewies durch die Untersuchung der Kotproben von Mutterkühen, dass die **Ausscheidung** von VTEC je nach Probenahmezeitpunkt und Haltungsform variiert. Demnach wurde dieses Pathovar bei der ersten Probenahme im November 2000 lediglich bei zwei (4,0 %) von 50 im Stall gehaltenen Tieren nachgewiesen. Dagegen erwiesen sich zum zweiten Untersuchungszeitpunkt im August 2001 66,7 % (36/54) der nun auf der Weide gehaltenen weiblichen Rinder als VTEC-positiv. Die dritte Beprobung im November 2001 nach erneuter Aufstallung der Tiere ergab abermals einen Rückgang der Ausscheidungsrate; so ließen sich bei 19 (36,5 %) von 52 Mutterkühen VTEC detektieren. Hervorzuheben ist, dass sich kein

Tier der insgesamt 61 untersuchten weiblichen Rinder bei allen drei Erhebungen als positiv erwies, aber schlussendlich bei 57 verschiedenen Tieren VTEC gefunden wurden (BÜLTE, 2004). Übereinstimmend mit dieser Tendenz vertreten auch HEUVELINK et al. (1998b) die Auffassung, dass eine einzige Probenahme in einem Betrieb kein aussagekräftiges Ergebnis über die Prävalenz von VTEC liefert, und diese Erreger mit größerer Wahrscheinlichkeit im Sommer anzutreffen sind. Als Begründung hierfür werden die unterschiedliche Haltung (Stall oder Weide) und die daraus hervorgehende abweichende Fütterung sowie das günstigere Klima für das Überleben der Bakterien im Sommer vermutet. Von dieser Ansichtswise abweichende Ergebnisse lieferten die Erhebungen von JONSSON et al. (2001). Von 12 im Vorfeld als VTEC O157:H7-positiv identifizierten Kälbern konnten diese Erreger lediglich bei den Tieren in Stallhaltung weiterhin nachgewiesen werden. Dagegen erwiesen sich alle sechs Kälber in Weidehaltung an den insgesamt fünf Beprobungsterminen als VTEC-negativ. Wieder andere Versuche ergaben keine saisonale Abhängigkeit (SHERE et al., 1998). Allgemein wird jedoch von einer größeren Prävalenz im Sommer ausgegangen (HEUVELINK et al., 1998b; HANCOCK et al., 2001; BÜLTE, 2004; GUNN et al., 2007).

Die horizontale **Übertragung** von Tier zu Tier gilt als wichtiger Faktor für die Verbreitung von VTEC innerhalb eines Betriebes, aber auch biotische und abiotische Faktoren in der Umgebung der Tiere wie Stallfliegen, Vögel sowie kontaminiertes Futter und Wasser werden als Überträger in Betracht gezogen (HEUVELINK et al., 1998b; SHERE et al., 1998; HANCOCK et al., 2001). Bei Freilandhaltung repräsentieren durch Rinderfäzes mit den Erregern kontaminierte Weiden ein Infektionsrisiko (HEUVELINK et al., 1998b), wobei als Fazit neuerer Untersuchungen anzunehmen ist, dass saisonal mit VTEC infizierte Tiere und kontaminierte Weiden keine Infektion in der folgenden Saison hervorrufen (SCHOUTEN et al., 2008).

Die Begründung für den Status als **Hauptreservoir** für VTEC sehen einige Autoren in der Besonderheit des Verdauungssystems der Wiederkäuer (GRAUKE et al., 2002). Den Protozoen als natürlichen Pansenbewohnern wurde, aufgrund einer möglichen Beteiligung am Überleben der Erreger und deren Transport vom Rumen in den Darmtrakt, eine Wirtsfunktion für VTEC in diesem Vormagen zugesprochen. Die Untersuchungsergebnisse bezüglich der Lokalisation dieses Pathovars im Gastrointestinaltrakt differierten jedoch. Einerseits ergaben Erhebungen, dass diese pathogenen Bakterien nicht durch die Protozoen aufgenommen zu werden scheinen, weshalb geschlussfolgert wurde, dass durch das Vorhandensein der Protozoen nur eine geringe bzw. keine Beeinflussung der VTEC-Population im positiven oder negativen

Sinn vorliege, und dass die Pansenumgebung als bevorzugter Lebensraum unwahrscheinlich sei (BUROW et al., 2005). BROWN et al. (1997) bewiesen dagegen durch die Sektion von neun artifiziell mit *E. coli* O157:H7 kontaminierten Kälbern, dass diese Keime bei allen Tieren im Rumen nachzuweisen waren. Allerdings konnten die Erreger bei allen Kälbern ebenso im Omasum gefunden werden und bei sieben Tieren im Retikulum, im distalen Caecum, in der Colon-Spirale und bei sechs Kälbern im proximalen Caecum. Lediglich im Abomasum wurden *E. coli* O157:H7 nicht ermittelt. Im Gegensatz dazu zogen GRAUKE et al. (2002) durch die Untersuchung von oral mit *E. coli* O157:H7 inokulierten adulten Rindern und Schafen die Bilanz, dass das Colon die primäre Lokalisation für die pathogenen Erreger sei, und diese nicht lange in den Vormägen sowie im Abomasum und im Duodenum persistierten. CRAY und MOON (1995) stellten bei der Sektion von adulten Rindern und entwöhnten Kälbern nach drei Tagen VTEC O157:H7 bei drei von drei adulten Tieren in Pansen und Caecum und bei zwei von drei Tieren im Abomasum und im Colon fest. Bei Kälbern wiesen sie die pathogenen Bakterien bei drei von drei Tieren in Pansen, Retikulum, Ileum, Caecum und Colon nach und bei zwei von drei Tieren im Abomasum. Bei der Sektion nach 14 bis 18 Tagen waren VTEC O157:H7 bei fünf von sechs Kälbern in Caecum und Colon und bei drei von vier Tieren im Rumen zu diagnostizieren. Als Ursache für die Diskrepanzen der Studien wird das unterschiedliche Alter der Versuchstiere und die damit zusammenhängende abweichende Mikroflora für möglich gehalten, so dass kein letztendliches Resümee gezogen werden kann (GRAUKE et al., 2002).

Die **Ausscheidungsdauer** unterscheidet sich von Tier zu Tier und ist altersabhängig. So wurde bewiesen, dass einige Tiere nach artifizieller Kontamination umgehend frei von *E. coli* O157:H7 waren (nicht infiziert), während andere Wiederkäuer diese Erreger wiederum etwa eine Woche, einen Monat oder mehr als zwei Monate *post inoculationem* mit dem Kot ausgeschieden haben (GRAUKE et al., 2002). Untersuchungen von CRAY und MOON (1995) ergaben für Kälber eine längere und größere Ausscheidungsrate als für adulte Rinder. Analog hierzu kamen auch HEUVELINK et al. (1998b) durch die Untersuchung von auf natürlichem Weg infizierten Wiederkäuern zu der Auffassung, dass die Ausscheidung von VTEC O157:H7 bei jungen Tieren höher ist als bei adulten Rindern. Als Ursache hierfür werden Unterschiede in der Pansenfunktion und Diskrepanzen in Fütterung, Immunantwort und Management angenommen. Versuche mit verschiedenen *E. coli*-Pathotypen in Schafen zeigten, dass VTEC eine längere Persistenz als ETEC- und EPEC-Stämme aufweisen (CORNICK et al., 2000). Allgemein besteht die Vermutung, dass **Managementmethoden** wie

Fütterung und Haltung die Ausscheidung von VTEC durch große und kleine Wiederkäuer beeinflussen (KUDVA et al., 1997; CRAY et al., 1998). Bereits 1967 und 1969 wurde beschrieben, dass Futterreduktion bzw. Futterentzug die Population von *E. coli* und Salmonellen im Pansen und in den Fäzes der Tiere ansteigen lässt (BROWNLIE und GRAU, 1967; GRAU et al., 1969). Die Studie von RASMUSSEN et al. (1993) ergab, dass die Vermehrung von *E. coli* O157:H7 bei wohlgenährten Rindern unterdrückt wurde, und im Gegensatz dazu die Inhibierung bei Futterentzug für 24 bis 48 Stunden wegfiel. Eine andere Arbeit brachte eine größere Empfindlichkeit von vier bis fünf Monate alten entwöhnten Kälbern gegenüber der Infektion mit *E. coli* O157:H7 bei Futterentzug zwei Tage vor der artifiziellen Kontamination mit diesem Erreger als bei Tieren ohne diätetischen Stress hervor. Das Fasten einen Tag oder zwei Wochen nach der Inokulation hatte dagegen nur eine geringe Auswirkung auf die Ausscheidungsrate dieser Keime durch die Kälber (CRAY et al., 1998). Ebenso kamen HARMON et al. (1999) durch ihre Ausarbeitung zu der Ansicht, dass der Futterentzug bei bereits *E. coli* O157:H7-ausscheidenden Tieren lediglich eine geringe Auswirkung auf die Proliferation im Pansen und die Ausscheidung der Erreger mit dem Kot hat. Der Stellenwert der Futterzusammensetzung ist ebenfalls noch nicht ausreichend geklärt (TKALCIC et al., 2000). Von praktischer Bedeutung wäre das möglicherweise erhöhte Risiko der Schlachttierkörperkontamination während der üblichen Hungerperioden von Schlachttieren vor der Schlachtung aufgrund der damit verbundenen Auswirkung auf die Ausscheidung von VTEC (HARMON et al., 1999).

GUNN et al. (2007) berichteten von weiteren **Risikofaktoren** für die Ausscheidung von VTEC O157-Stämmen durch Fleischrinder. So waren schottische Farmen, die Kälber zukaufen, gefährdeter als Betriebe, welche ihre eigene Nachzucht verwendeten; außerdem zeigten größere Herden eine höhere Prävalenz als kleinere. Auf Farmen mit höherem Durchschnittsalter der Tiere war das Auftreten eines VTEC-positiven Tieres weniger wahrscheinlich als in Betrieben mit jüngerem Tierbestand. Fleischrinder von Milchbetrieben waren zudem häufiger betroffen als von anderen Farmen. Darüber hinaus schlussfolgerte diese Arbeitsgruppe, dass die Anwesenheit von Schweinen ein größeres Risiko bedeutete, und im Einklang zu der Studie von BÜLTE (2004) konnten auch sie im Sommer mehr VTEC-positive Tiere nachweisen als im Winter. Obwohl aufgestallte Gruppen weniger häufig Ausscheider aufwiesen als Herden in Weidehaltung, war jedoch die Anzahl der insgesamt betroffenen Tiere in einer positiven, im Stall gehaltenen Gruppe größer als bei Herden in Freilandhaltung. Im Gegensatz dazu waren aufgestallte Rinder, die im Zeitraum von vier Wochen vor der Probenahme eine Änderung im Management oder in der Fütterung erfahren

hatten, mit einer größeren Wahrscheinlichkeit VTEC-positiv als Tiere in Weidehaltung (GUNN et al., 2007). Ein ergänzender Risikofaktor für die Ausscheidung der pathogenen Erreger wird zudem in der Antibiotikaaanwendung vermutet (SHERE et al., 1998), wobei andere Autoren weder für die Nutzung antimikrobieller Wirkstoffe, noch von Ionophoren oder Kokkzidiostatika eine Korrelation mit der VTEC-Ausscheidung feststellen konnten (DARGATZ et al., 1997). Die **Überlebensrate** von VTEC in Rinderkot verhält sich je nach Erregerkonzentration und Temperatur unterschiedlich. So berichteten WANG et al. (1996) von der Detektion des Erregers bei 37 °C für 42 bzw. 49 Tage (Inokulum: 10^3 und 10^5 KbE/g), bei 22 °C für 49 und 56 Tage und bei 5 °C für 63 bis 70 Tage und bewiesen zudem, dass die Stämme während der gesamten Versuchsdauer in der Lage blieben, Verotoxine zu produzieren. Prinzipiell analog dazu konnten FUKUSHIMA et al. (1999b) bei artifiziell kontaminiertem Rinderkot mit Konzentrationen von 10^1 KbE/g sowohl bei 5 °C als auch bei 25 °C VTEC für ein bis vier Wochen und bei 15 °C für ein bis acht Wochen nachweisen. Wurden die Inokulationen auf 10^3 bzw 10^5 KbE/g erhöht, überlebten die Erreger bei 5 °C und 25 °C bis zu 12 bzw. 14 Wochen und bei 15 °C bis zu 18 Wochen. Diese Ausführungen lassen auf die von Rinderkot ausgehende Gefahr der Kontamination von Lebensmitteln und der Umwelt sowie auf die Bedeutsamkeit einer geeigneten Behandlung bzw. Nutzung der tierischen Ausscheidungen zur Kontrolle der Ausbreitung von VTEC schließen (WANG et al., 1996; FUKUSHIMA et al., 1999b).

Adulte Wiederkäuer gelten als Träger von VTEC, weisen jedoch keine klinischen Symptome auf (BEUTIN et al., 1993; BEUTIN et al., 1994; ARMSTRONG et al., 1996). Das **Krankheitsbild** bei Neugeborenen bis einige Monate alten Kälbern äußert sich durch eine muköse und teilweise auch hämorrhagische Diarrhö, die sich von der durch ETEC ausgelösten wässrigen Diarrhö unterscheidet. Die Erkrankung endet nur selten mit dem Tod, ist aber häufig auch nach Behandlung redundant und führt zu Dehydratation, Schwäche und vermindertem Wachstum. Bei einer Sektion der betroffenen Tiere sind die Läsionen hauptsächlich im Dickdarm aufzufinden; in schweren Fällen ist eine Ausbreitung auf den Dünndarm feststellbar. Zusätzlich können lokalisierte oder diffuse Hämorrhagien auftreten. HUS oder andere systemische Komplikationen wurden bei Kälbern, wahrscheinlich aufgrund des Fehlens spezifischer Rezeptoren auf den glomerulären Endothelzellen, noch nicht beobachtet. Serotypen, die häufig mit Diarrhö bei jungen Kälbern in Zusammenhang gebracht werden, sind O5:H⁻, O8:H8, O20:H19, O26:H11, O103:H2, O111:H⁻, O111:H8; O111:H11, O118:H16 und O145:H⁺. Einige dieser Serotypen sind auch bei Menschen auffindbar (ref. in

MAINIL, 1999). Verschiedene Arbeiten thematisieren eine **Altersabhängigkeit** für das Auftreten klinischer Symptome bei Tieren. Eine Inokulationsstudie mit entwöhnten Kälbern und adulten Rindern mit dem von einem gesunden Kalb kultivierten VTEC O157:H7-Stamm 3081 zeigte, dass 25 der 29 Tiere klinisch symptomlos blieben und es nur bei vier der 17 Kälber zu einer vorübergehenden unblutigen Diarrhö kam. Die histologische Untersuchung verschiedener Organe (Hirnstamm, Nieren, Jejunum, Ileum, Caecum und Colon) ergab keine signifikanten Läsionen. Abschließend kam die Arbeitsgruppe zu der Auffassung, dass der verwendete Stamm keine Pathogenität für Rinder besitzt (CRAY und MOON, 1995). Im Unterschied dazu sprechen die Ergebnisse weiterer Studien für andere Einschätzungen. So belegen die Untersuchungen von DEAN-NYSTRÖM et al. (1997) die krankheitsverursachende Wirkung von VTEC O157:H7-Stämmen auf neonatale, unter 36 Stunden alte Kälber. Die Tiere zeigten 18 bis 72 Stunden nach der Inokulation Diarrhö, Colon-Ödeme und A/E-Läsionen in Rektum, Caecum, Colon und Ileum und ein Tier ebenso in Jejunum und Abomasum. Auffällig war die größere Virulenz der Bakterien in unter 12 Stunden gegenüber 30 bis 36 Stunden alten Kälbern zum Zeitpunkt der Inokulation. Bei *E. coli*-Mastitiden scheinen VTEC gemeinhin nur eine geringe Rolle zu spielen. So wurden in einer Erhebung von 145 Milchproben Mastitis-kranker Rinder vier (2,8 %) als VTEC-positiv detektiert (STEPHAN und KÜHN, 1999), in einer anderen Studie nur eine (0,5 %) unter 223 Proben (ZSCHÖCK et al., 1998).

Der **Infektion des Menschen** über den direkten Tierkontakt wird eine erhebliche Bedeutung zugesprochen. So gelten die großen Wiederkäuer als Hauptinfektionsquelle, wohingegen vom Tier stammende Lebensmittel ein geringeres Gefährdungspotential darzustellen scheinen. Von Relevanz sind aber auch über Rinderkot mit VTEC kontaminiertes Abwasser sowie Obst und Gemüse (BEUTIN et al., 1994; BÜLTE, 2002). Dementsprechend gilt eine Verminderung der Prävalenz von VTEC in Rindern als eine Strategie zur **Reduzierung von Lebensmittelkontaminationen und humanen Infektionen** durch diese Pathovargruppe (DEAN-NYSTRÖM et al., 1997).

2.4.1.2 Wildwiederkäuer

In Wildwiederkäuern wurde abweichend zu den Erhebungen bei Hauswiederkäuern keine Prävalenzzunahme im Sommer beobachtet (DUNN et al., 2004), dennoch sind VTEC in den

Fäzes dieser Tiere ebenfalls regelmäßig nachweisbar (EFSA, 2007). Eine mögliche Rolle dieser Tiere als Reservoir für in derselben Umgebung lebende domestizierte Wiederkäuer wird verschiedentlich in Betracht gezogen (DUNN et al., 2004). Inokulationsversuche besagen auch für Wildwiederkäuer ein Ausscheiden von VTEC ohne das Auftreten klinischer Symptome und zudem das Vorkommen von Kontakttransmissionen. Zusätzlich waren diese Erreger in allen Teilen des Gastrointestinaltraktes sowohl in den Fäzes als auch in Gewebeproben (hier geringere Keimzahlen) detektierbar, wobei der Dickdarm als Lokalisation der längeren Persistenz angenommen wurde (FISCHER et al., 2001). Tabelle 7 soll einen exemplarischen Überblick über Prävalenzangaben zu VTEC in Wildwiederkäuerfäzes geben.

Tabelle 7: Nachweis von VTEC bei Wildwiederkäuern

Land	Tierart	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	VTEC O157	
D ¹⁾	Rehe	53	4 (7,5)	k.A. ²⁾	THOMS, 1999
FIN ³⁾	Rentiere	1387	k.A.	0	LAHTI et al., 2001
GB ⁴⁾	Wild	10	k.A.	2 (20,0)	CHAPMAN und ACKROYD, 1997
N ⁵⁾	Elche	39	0	0	WASTESON et al., 1999
	Rentiere	17	0	0	
	Wild	207 ⁶⁾	2 (0,9)	k.A.	LILLEHAUG et al., 2005
S ⁷⁾	Elche	84	k.A.	0	WAHLSTRÖM et al., 2003
	Rehe	195	k.A.	0	
	Dam- und Rothirsche	90	k.A.	0	
USA ⁸⁾	Wild	108	k.A.	2 (1,9)	RICE und HANCOCK, 1995
	Weiß- Schwanz- Wedel-Hirsche	338 (gejagt)	k.A.	0	DUNN et al., 2004
		55 (Gatterwild)	k.A.	1 (1,8)	

¹⁾ Deutschland

²⁾ keine Angabe

³⁾ Finnland

⁴⁾ Großbritannien

⁵⁾ Norwegen

⁶⁾ Poolproben von 135 Rothirschen, 127 Elchen, 150 Rentieren und 206 Rehen

⁷⁾ Schweden

⁸⁾ Vereinigte Staaten von Amerika

2.4.1.3 Schweine

Bei Schweinen kann im Gegensatz zu Rindern keine saisonale Abhängigkeit der Ausscheidung beobachtet werden (MILNES et al., 2008). Eine Untersuchung von 225 porcinen *vtx2*-positiven Stämmen ergab für alle VTEC ein VT 2e-Bildungsvermögen. Bei keinem Stamm waren andere Toxin-Varianten oder Gene für Intimin dokumentierbar (BAUERFEIND et al., 2004). VT 2e-positive Stämme führen bei Absatzferkeln zur Ödemkrankheit (RKI, 1996b). Die betroffenen Tiere werden häufig tot aufgefunden; bei anderen kommt es zu nervösen klinischen Symptomen wie Ataxie oder Konvulsion und zu subkutanen Ödemen im Kopfbereich. Nur in seltenen Fällen weisen die Tiere Durchfall auf (ref. in MAINIL, 1999). Am häufigsten sind die beteiligten Stämme den Serogruppen O138, O139 und O141 zuzuordnen (KRAMER, 1960). Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über Prävalenzangaben zu VTEC in Proben porciner Herkunft.

Tabelle 8: Nachweis von VTEC bei Schweinen

Land	Tierart	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	VTEC O157	
D ¹⁾	Mastscheine	75	5 (6,7)	k.A. ²⁾	BÜLTE et al., 1990
	Schweine	120	9 (7,5)	0	BEUTIN et al., 1993
	Läuferschweine	125	73 (58,4)	k.A.	GALLIEN et al., 1994
	Ferkel (1.-6. Lebenswoche)	80	0	0	
	Schweine	1810	215 (11,9)	k.A.	BAUERFEIND et al., 2004
GB ³⁾	Schweine	2114	k.A.	6 (0,3)	MILNES et al., 2008
N ⁴⁾	Schweine	1976	k.A.	2 (0,1)	JOHNSEN et al., 2001
¹⁾ Deutschland		²⁾ keine Angabe	³⁾ Großbritannien		⁴⁾ Norwegen

Untersuchungen von Absatzferkeln ergaben für gesunde (14,0 %) sowie für intestinal erkrankte Tiere (14,3 %) nahezu identische Prävalenzen für VTEC. Aus diesen Resultaten wurde geschlussfolgert, dass VTEC und Serogruppen, die der Ödemkrankheit zuzuordnen sind, zur physiologischen intestinalen Mikroflora der Absatzferkel gehören. Dagegen beweist die geringe Häufigkeit in neugeborenen Ferkeln, dass die pathogenen Erreger hier nicht natürlicherweise vorkommen. Die Zunahme dieses Pathovars wird mit dem Vorgang des Absetzens in Zusammenhang gebracht (GANNON et al., 1988). Schweine werden jedoch trotz

alledem nicht als Reservoir für humanpathogene VTEC-Stämme angesehen (GANNON et al., 1988; EFSA, 2007).

2.4.1.4 Pferde

Die Erhebungen von VTEC-Prävalenzdaten in **Pferdefäzes** bringen unterschiedliche Ergebnisse zum Ausdruck (siehe Tabelle 9). So machten HEUVELINK et al. (1998b) bei einem von vier untersuchten Pferden VTEC ausfindig, allerdings waren diese Tiere im selben Gebäude wie VTEC-positive Rinder untergebracht. Dagegen wiesen GOLL und BÜLTE (2004) in 100 Pferdekotproben keine VTEC der Serogruppe O157 nach und kamen insgesamt zu dem Fazit, dass Pferde kein Reservoir für VTEC einschließlich pathogener O157-Stämme darstellen.

Tabelle 9: Nachweis von VTEC bei Pferden

Land	Tierart	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	VTEC O157	
D ¹⁾	Pferde	100	k.A. ²⁾	0	GOLL und BÜLTE, 2004
NL ³⁾	Pferde	4	k.A.	1 (25,0)	HEUVELINK et al., 1998b
	Pony	1	k.A.	0	
USA ⁴⁾	Fohlen mit Diarrhö	63	3 (4,8)	0	HOLLAND et al., 1996
	Fohlen ohne Diarrhö	30	0	0	

¹⁾ Deutschland

²⁾ keine Angabe

³⁾ Niederlande

⁴⁾ Vereinigte Staaten von Amerika

2.4.1.5 Kleine Haustiere

Bei **Hunden, Katzen und Kaninchen** sind VTEC ebenfalls nachweisbar, wie exemplarisch in Tabelle 10 aufgeführt ist. Prävalenzuntersuchungen von SMITH et al. (1998) ergaben für diarrhöranke Katzen eine Häufigkeit von 9,7 % und für gesunde Katzen von 16,7 %, woraus die Erkenntnis entstand, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem intestinalen Vorkommen von VTEC und Durchfallerkrankungen bei Katzen vorliegt. Dagegen waren

ABAAS et al. (1989) einer gegensätzlichen Auffassung. In unterschiedlichen Studien wurden bei durchfallkranken Hunden häufiger VTEC diagnostiziert als bei gesunden Tieren (HAMMERMUELLER et al., 1995; SANCAK et al., 2004). Ein möglicher Zusammenhang wird auch für die Erkrankung „idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy“ („Alabama rot“) bei Greyhounds gesehen, die große Ähnlichkeiten zu dem HUS-Syndrom des Menschen aufweist (ref. in ARMSTRONG et al., 1996). GARCÍA und FOX (2003) kamen durch die Prävalenzuntersuchungen von VTEC bei Kaninchen zu der Annahme, dass diese ebenfalls als Wirt für die pathogenen Erreger fungieren und somit ein zoonotisches Risiko für Menschen darstellen könnten.

Tabelle 10: Nachweis von VTEC bei kleinen Haustieren

Land	Tierart	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	VTEC O157	
CDN ¹⁾	Katzen (mit Diarrhö)	113	11 (9,7)	0	SMITH et al., 1998
	Katzen (ohne Diarrhö)	66	11 (16,7)	0	
D ²⁾	Hunde	63	3 (4,8)	0	BEUTIN et al., 1993
	Katzen	65	9 (13,8)	0	
	Hunde	25	1 (4,0)	0	GALLIEN et al., 1994
	Katzen	29	0	0	
GB ³⁾	Hunde (mit akuter Diarrhö)	57	14 (24,6)	0	SANCAK et al., 2004
	Hunde (mit chronischer Diarrhö)	82	23 (28,1)	0	
	Hunde (ohne Diarrhö)	122	2 (1,6)	0	
NL ⁴⁾	Kaninchen	1	k.A. ⁵⁾	0	HEUVELINK et al., 1998b
USA ⁶⁾	Kaninchen	49	8 (16,3)	0	GARCÍA und FOX, 2003

¹⁾ Kanada

²⁾ Deutschland

³⁾ Großbritannien

⁴⁾ Niederlande

⁵⁾ keine Angabe

⁶⁾ Vereinigte Staaten von Amerika

2.4.1.6 Geflügel und Wildvögel

Auch Wildvögel und Wirtschaftsgeflügel wurden auf die Prävalenz von VTEC untersucht; einige Resultate hierzu sind in Tabelle 11 dargestellt. Das Vorkommen der pathogenen Bakterien in Vögeln ist möglicherweise durch deren Nahrungsaufnahme von Plätzen wie Abfalldemonien oder kotkontaminiertem Weideland, aus Abwässern bzw. durch den Verzehr kontaminierter Schalentiere begründet (WALLACE et al., 1997). Bei Tauben ist ein häufiges Vorkommen des Verotoxin-Typs 2f auffällig. So stellten MORABITO et al. (2001) diese Toxin-Variante bei allen von Tauben isolierten VTEC fest. Es waren häufiger juvenile als adulte Vögel betroffen, und die Tiere wiesen keine klinischen Symptome auf. Auch andere Erhebungen ergaben ein positives Ergebnis für VT 2f bei Tauben (KOBAYASHI et al., 2002). Es wird angenommen, dass Wildvögel als Vehikel der Übertragung zwischen verschiedenen Farmen fungieren und die Persistenz in Nutztieren begünstigen, da VTEC-positive Tiere in der Umgebung von Nutztierbetrieben wie Rinder- und Schweinefarmen ausfindig gemacht wurden. Trotzdem führen verschiedene Studien zu der Ansicht, dass in Wildvögeln ebenso wie in Wirtschaftsgeflügel kein bedeutsames Reservoir für VTEC zu sehen ist (KOBAYASHI et al., 2002; MØLLER NIELSEN et al., 2004; WANI et al., 2004; EFSA, 2007). Entgegengesetzt dazu lässt die Untersuchung eines Ausbruchgeschehens in Großbritannien darauf schließen, dass Vögel als Ursache humaner VTEC-Infektionen in Betracht zu ziehen sind, da die humanen VTEC-Stämme mit einem aus Vogelkot kultivierten Stamm identisch waren (EJIDOKUN et al., 2006).

Tabelle 11: Nachweis von VTEC bei Wildvögeln und Wirtschaftsgeflügel

Land	Tierart	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	VTEC O157	
D ¹⁾	Hühner	144	0	0	BEUTIN et al., 1993
DK ²⁾	Vögel (nahe Rinderfarmen)	125	2 (1,6)	k.A. ³⁾	MØLLER NIELSEN et al., 2004
	Vögel (nahe Schweinefarmen)	119	2 (1,7)	k.A.	
FIN ⁴⁾	Möwen	86	0	0	KOBAYASHI et al., 2002
	Tauben	33	0	1 (3,0)	
	Broiler	199	0	0	
IND ⁵⁾	Hühner	401	0	0	WANI et al., 2004
	Tauben	25	0	0	
S ⁶⁾	Möwen	111	k.A.	0	WAHLSTRÖM et al., 2003
	Gänse	105	k.A.	0	
¹⁾ Deutschland		²⁾ Dänemark	³⁾ keine Angabe		
⁴⁾ Finnland		⁵⁾ Indien	⁶⁾ Schweden		

2.4.2 Vorkommen in Lebensmitteln

Wie bereits thematisiert, werden VTEC als eine der größten Herausforderungen an die Lebensmittelindustrie seit dem Botulismus beschrieben. Ursachen hierfür sind die hochgradige Infektiosität für den Menschen, die Auslösung schwerwiegender Erkrankungen mit teilweise langanhaltenden gravierenden Folgen, die sehr geringe Infektionsdosis, das weltweite Vorkommen und das Auftreten in Wiederkäuern und anderen Tieren bei ausbleibender klinischer Symptomatik (BELL, 2002). Diese Aspekte erklären den Status eines wichtigen, sogenannten „foodborne pathogens“ (EFSA, 2007). Gesamtheitlich werden rohe Lebensmittel wie rohes Fleisch, Rohwurst, Hackfleischerzeugnisse, Rohmilch und -erzeugnisse, Gemüse, Salat, Obst, nicht pasteurisierte Obstsäfte sowie andere Lebensmittel, welche direkt oder indirekt durch Rinderkot oder fäkale Ausscheidungen anderer Tiere kontaminiert wurden, ebenso wie Trinkwasser, als potentielle Risikofaktoren für EHEC-Infektionen dokumentiert (BELL, 2002; BÜLTE, 2002). Dagegen ist davon auszugehen, dass von Lebensmitteln wie Brüh- oder Kochwurst und pasteurisierter Milch, die einer

entsprechenden Temperaturführung unterzogen wurden, keine Gefahr ausgeht (BÜLTE, 2002). So ergab eine vor diesem Hintergrund durchgeführte Studie, dass pathogene *E. coli* nicht sonderlich hitzeresistent sind, und daher eine Erhitzung auf 68,3 °C Kerntemperatur für mehrere Sekunden eine Abtötung bewirkt. Im Gegensatz dazu verursacht eine Kühlung von 2 °C bis 5 °C gemäß den in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzten Temperaturen zwar keine Vermehrung, aber auch kein Absterben von *E. coli* (BELL, 2002). Selbst eine neunmonatige Lagerung von mit *E. coli* O157:H7 kontaminiertem Hackfleisch bei -20 °C zeigte nur eine geringe Abnahme der Keimzahl, wodurch auf eine gute Überlebensfähigkeit des Organismus in eingefrorenem Hackfleisch geschlossen wurde (DOYLE and SCHOENI, 1984). Die pathogenen Erreger überleben ebenso breite Spektren von pH- (säuretolerante Stämme bis pH 1,5) und a_w -Werten (BELL, 2002; BfR, 2005).

VTEC-Stämme der Serogruppe O157 sind nur selten in Lebensmitteln nachweisbar (ref. in BÜLTE, 2001), und das Vorkommen von *eae*-Gen positiven Stämmen erweist sich ebenso als relativ gering (BÜLTE, 2001). Es existieren jedoch von dieser Ansicht abweichende Erhebungen, denn MORA et al. (2007a) stellten bei 26 % der aus Rinderhackfleisch isolierten VTEC-Stämme das Intimin-Bildungsvermögen fest. Einen Überblick über die Situation in Lebensmitteln soll in den Tabellen 12, 13 und 14 aufgezeigt werden.

Tabelle 12: Nachweis von VTEC in Fleisch und Fleischerzeugnissen in Europa

Land	Lebensmittel	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	VTEC O157	
D ¹⁾	Rinderhackfleisch	1381	95 (6,9)	3 (0,2)	BÜLTE, 2001
	Lammfleisch	267	14 (5,2)	0	
	Schweinefleisch	307	1 (0,3)	1 (0,3)	
	Rindfleisch	177	8 (4,5)	k.A. ²⁾	HARTUNG, 2007
	Schafffleisch	36	4 (11,1)	k.A.	
	Schweinefleisch	148	1 (0,7)	k.A.	
	Wildfleisch	121	12 (9,9)	k.A.	
E ³⁾	Rinderhackfleisch	785	95 (12,1)	8 (1,0)	MORA et al., 2007a
F ⁴⁾	Rindfleisch	411	16 (3,9)	0	PRADEL et al., 2000
I ⁵⁾	Rinderhackfleisch	931	k.A.	4 (0,4)	CONEDERA et al., 2004
GB ⁶⁾	rohes Fleisch und Fleischprodukte	1190	k.A.	2 (0,2) ⁷⁾	COIA et al., 2001
GB ⁸⁾	Rohfleisch- produkte	4983	k.A.	22 (0,4)	CHAPMAN et al., 2001

¹⁾ Deutschland²⁾ keine Angabe³⁾ Spanien⁴⁾ Frankreich⁵⁾ Italien⁶⁾ Großbritannien/Schottland⁷⁾ Rinderhackfleischprodukte⁸⁾ Großbritannien

Ebenso wie andere Lebensmittel boviner Herkunft gelten Rohmilch und Rohmilchprodukte als Quelle alimentärer Infektionen durch VTEC und bedeuten eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit (MURPHY et al., 2007). Eine einfache, kostengünstige und praktische Methode zur Überprüfung großer Gruppen von Milchrindern auf diesen pathogenen Erreger stellt die Untersuchung von Milchfiltern auf VTEC dar (MURPHY et al., 2005). Positive VTEC-Ergebnisse sind dahingehend als Index der Kontamination während des Melkvorgangs, für die positive Ausscheidung der Tiere sowie als Gefahr für die Übertragung auf den Menschen einzuschätzen (MURPHY et al., 2007).

Tabelle 13: Nachweis von VTEC in Milch und Milchprodukten in Europa

Land	Lebensmittel	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	VTEC O157	
B ¹⁾	Rohmilchkäse (gefroren)	153	0	0	VIVEGNIS et al., 1999
CH ²⁾	Ziegenmilch	344	9 (2,6) ³⁾	0	MUEHLHERR et al., 2003
	Schafsmilch	63	3 (4,8) ³⁾	0	
D ⁴⁾	Rohmilchkäse	267	2 (0,7)	0	BÜLTE, 2001
	Stutenrohmilch	1028	0	0	
	Rohmilch ⁵⁾	977	10 (1,0)	k.A. ⁶⁾	HARTUNG, 2007
	Rohmilch ab Hof	324	2 (0,6)	k.A.	
F ⁷⁾	Käse	603	5 (0,8)	0	PRADEL et al., 2000
GB ⁸⁾	Rohmilch	500	k.A.	0	COIA et al., 2001
	Rohmilchkäse	739	k.A.	0	
I ⁹⁾	Milchprodukte				CONEDERA et al., 2004
	- pasteurisiert/Rind	657	k.A.	0	
	- roh/Rind	811	k.A.	0	
	- pasteurisiert/Schaf	477	k.A.	0	
	- roh/Schaf	507	k.A.	0	
	- Mozzarella ¹⁰⁾	501	k.A.	0	
IRL ¹¹⁾	Milchfilter ¹²⁾	161	9 (5,6)	5 (3,1)	MURPHY et al., 2007

¹⁾ Belgien ²⁾ Schweiz ³⁾ keine Erregerisolierung, nur *vtx*-Nachweis
⁴⁾ Deutschland ⁵⁾ Sammelmilch ⁶⁾ keine Angabe
⁷⁾ Frankreich ⁸⁾ Großbritannien/Schottland ⁹⁾ Italien
¹⁰⁾ Wasserbüffelmilch ¹¹⁾ Irland ¹²⁾ von bovinen, ovinen und caprinen Herden

Tabelle 14: Nachweis von VTEC in Lebensmitteln außerhalb Europas

Land	Lebensmittel	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	VTEC O157	
BR ¹⁾	Rohmilchkäse	50	3 (6,0)	k.A. ²⁾	PANETO et al., 2007
CN ³⁾	Rindfleisch	40	k.A.	2 (5,0)	ZHOU et al., 2002
	Schweinefleisch	30	k.A.	1 (3,3)	
PE ⁴⁾	Verschiedene	407	k.A.	33 (8,1)	MORA et al., 2007b
USA ⁵⁾	Rinderhackfleisch	296	50 (16,8) ⁶⁾	k.A.	SAMADPOUR et al., 2002

¹⁾ Brasilien²⁾ keine Angabe³⁾ China⁴⁾ Peru⁵⁾ Vereinigte Staaten von Amerika⁶⁾ keine Erreger-Isolierung, nur *vtx*-Nachweis

Obwohl viele verschiedene Lebensmittel als VTEC-positiv detektiert und mit VTEC-Infektionen in Verbindung gebracht werden, gilt ungenügend erhitztes Rinderhackfleisch als Hauptvektor für den Menschen (MORA et al., 2007a). Ebenso ist das Fleisch von Wildwiederkäuern mit humanen Erkrankungsfällen in Zusammenhang zu bringen (KEENE et al., 1997; RABATSKY-EHR et al., 2002). Da der Verzehr von Wildfleisch in vielen Ländern überwiegend von Jägern sowie deren Familien und Freunden erfolgt, wird ein Großteil des Fleisches keiner Fleischuntersuchung unterzogen. Zusätzlich birgt das unsaubere Erlegen und Aufbrechen ein größeres Risiko der fäkalen Kontamination (LILLEHAUG et al., 2005). Darüber hinaus muss ein potentiellies Risiko von durch Wildwiederkäuerfäzes kontaminiertem Wasser und kontaminierten Lebensmitteln in Betracht gezogen werden (RENTER et al., 2001). Die von durchgegartem Fleisch ausgehende Gefahr wird, wie bei Rindern, als gering angesehen, wohingegen für rohes Wildwiederkäuerfleisch und Wildrohwürste wie Salami ein größeres Risiko beschrieben wird (THOMS, 1999). In Schweinefleisch werden in überwiegender Zahl *vtx2e*-positive Stämme nachgewiesen, welche nicht mit humanen Erkrankungen assoziiert zu sein scheinen. Zudem sind die meisten Stämme *eae*- und *hly*_{EHEC}-negativ, so dass bei diesen Produkten von keiner Bedrohung für den Menschen auszugehen ist (BOUVET et al., 2002). Geflügelfleisch und Eier wurden bislang nicht mit lebensmittelbedingten VTEC-Ausbrüchen in Zusammenhang gebracht, ebenso wie Fisch und Meeresfrüchte, obwohl Trink- und Badegewässer einen wichtigen Übertragungsweg repräsentieren (BELL, 2002).

Auch auf **Schlachttierkörpern** werden wiederholt VTEC vorgefunden (Tabelle 15). Als Ursache hierfür sind die Kontamination des Schlachttierkörpers durch VTEC-positive Fäzes oder Fell der einzelnen Tiere, die Kreuzkontamination durch nah aneinander hängende Schlachttierkörper oder kontaminierte Geräte und zusätzlich der direkte Kontakt der Tiere vor der Schlachtung aufzuführen. Dies belegt die Bedeutsamkeit geeigneter Hygienestandards in Schlachtbetrieben zur Eindämmung der Kontamination von Schlachttierkörpern mit VTEC (ELDER et al., 2000; BONARDI et al., 2001). Untersuchungen von Umgebungsproben in Schlachtbetrieben vor Arbeitsbeginn beweisen jedoch die nicht immer erfolgreiche Elimination von VTEC durch Reinigung und Desinfektion (BOUVET et al., 2002). Die Tatsache, dass in Lebensmitteln von Wiederkäuern seltener VTEC nachgewiesen werden als auf Schlachttierkörpern, ist durch das Zurückdrängen dieser mesophilen pathogenen Erreger durch die sich unter vorschriftsmäßigen Kühlbedingungen vermehrenden psychrotrophen Mikroorganismen zu erklären (BÜLTE und HECKÖTTER, 1997).

Tabelle 15: Vorkommen von VTEC auf Schlachttierkörpern

Land	Tierart	Anzahl untersuchter Proben	Anzahl positiver Proben (%)		Quelle
			VTEC allgemein	VTEC O157	
D ¹⁾	Lamm	87	63 (72,4)	0	BÜLTE, 2001
F ²⁾	Schwein	546 ³⁾	140 (25,6) ⁴⁾	2 (0,4)	BOUVET et al., 2002
GB ⁵⁾	Rind	1500	k.A. ⁶⁾	21 (1,4)	CHAPMAN et al., 2001
	Lamm	1500	k.A.	10 (0,7)	
I ⁷⁾	Rind	100 ⁸⁾	k.A.	12 (12,0)	BONARDI et al., 2001
Mex ⁹⁾	Rind	258	2 (0,8)	1 (0,4)	VARELA HERNÁNDEZ et al., 2007

¹⁾ Deutschland²⁾ Frankreich³⁾ Proben von 182 Schlachttierkörpern⁴⁾ keine Erregerisolierung, nur *vtx*-Nachweis⁵⁾ Großbritannien⁶⁾ keine Angabe⁷⁾ Italien⁸⁾ äußere und innere Oberfläche⁹⁾ Mexiko

Die auffällig hohe VTEC-Detektionsrate auf Lammschlachttierkörpern von 72,4 % ist nach BÜLTE (2001) auf die häufig hygienewidrige schlachttechnologische Herrichtung von Schafschlachttierkörpern zurückzuführen. Zur Reduzierung der VTEC-Prävalenz auf Schlachttierkörpern empfiehlt dieser Autor das strikte Entfernen fäkal kontaminierter Bereiche (sogenanntes „Trimming“) und sieht dies als möglichen Lenkungspunkt („Critical Control Point“; CCP) im Rahmen des HACCP- („Hazard Analysis and Critical Control Point“) Konzeptes (BÜLTE, 2002).

2.4.3 Vorkommen bei Menschen

Bereits im Jahr 1983 wurden zwei Ausbrüche durch *E. coli* O157:H7 beschrieben. Betroffen waren 47 Menschen, welche symptomatisch starke Bauchschmerzen und abdominale Krämpfe sowie wässrige, später blutige Diarrhö und zudem in wenigen Fällen Fieber aufwiesen (RILEY et al., 1983). Die als Hämorrhagische Colitis (HC) bezeichnete Erkrankung wurde durch ungenügend erhitzte „Hamburger“ ausgelöst. Im selben Jahr stellten KARMALI et al. (1983) einen Zusammenhang zwischen VTEC in humanem Stuhl und vereinzelten Fällen des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) dar. Inzwischen gelten EHEC weltweit als häufigster Auslöser von HUS (MELLMANN et al., 2005). In Deutschland und vielen anderen

Ländern treten diese pathogenen Erreger endemisch auf (BEUTIN und NIEMER, 1995; BEUTIN, 1998). Gemäß §7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) ist jeglicher Nachweis von EHEC meldepflichtig, nach §6 ebenso Verdacht, Erkrankung und Tod durch HUS (ANONYMOUS, 2000).

2.4.3.1 Vorkommen und Ausbruchsgeschehen

In den Tabellen 16, 17 und 18 sind exemplarisch einige Ausbruchsgeschehen von humanen EHEC-Infektionen aus verschiedenen Ländern zusammengetragen. Eine Zunahme der Erkrankungshäufigkeit im Sommer wurde von BEUTIN und NIEMER bereits im Jahr 1995 beschrieben. In der Folgezeit wurde wiederum von einer Umkehrung dieser Saisonalität ausgegangen, da die in den Jahren 1995 und 1996 aufgetretene EHEC-Epidemie in Bayern ihren Höhepunkt in den Wintermonaten zeigte (BOCKEMÜHL und KARCH, 1996). Neueste Erkenntnisse erklären möglicherweise die widersprüchlichen Ergebnisse. So wurde für EHEC O157:H7 eine Prävalenzzunahme in den Sommermonaten und für Sorbitol-fermentierende (SF) EHEC O157:NM (non motile) in den Wintermonaten hervorgehoben (KARCH et al., 2005). Zur Weiterverbreitung des pathogenen Erregers tragen klinisch unauffällige Ausscheider bei. Untersuchungen von Ausbruchsgeschehen veranschaulichen, dass Erwachsene mit Kontakt zu erkrankten Kleinkindern häufig den gleichen Krankheitserreger ausscheiden, klinisch jedoch unauffällig sind. Nach Ansicht des Autors kann dies auf eine mögliche individuelle Immunität gegenüber EHEC-Erkrankungen hinweisen (BEUTIN, 1998).

Tabelle 16: Ausbrüche von EHEC-Infektionen in Deutschland

Zusammenhang Vektor	Serogruppe/ -typ	DF/HC (%)	HUS/TTP (%)	Tote (%)	Quelle
Kindertagesstätte: diverse LM, „person-to-person“	O157:H7	41	3 (7,3)	1 (2,4)	REIDA et al., 1994
Mortadella und Teewurst	O157:H ⁻	k.A. ¹⁾	28	3 [10,7]	AMMON et al., 1999
Rohmilch	O80:H ⁻ O145 ²⁾	ca. 50	1	k.A.	DREESMAN et al., 2007 RKI, 2008b
unklar	O157:H ⁻	20	18 (90,0)	k.A.	FRUTH et al., 2007

¹⁾ keine Angabe

²⁾ Serogruppe des HUS-Falls

[] bezogen auf HUS-Fälle

Die Inzidenzzahlen für VTEC schwanken zwischen 1,0 und 1,4 pro 100.000 Einwohner in Deutschland. So lagen die Werte für EHEC im Jahr 2004 bei 1,1, im Jahr 2005 bei 1,4, im Jahr 2006 bei 1,4 und im Jahr 2007 bei 1,0 Personen pro 100.000 Einwohner. In Abbildung 1 sind gemäß dem Infektionsschutzgesetz gemeldete Erkrankungen mit EHEC sowie HUS in Deutschland für die Jahre 2004 bis 2007 illustriert (RKI, 2006; RKI, 2007a; RKI, 2008c).

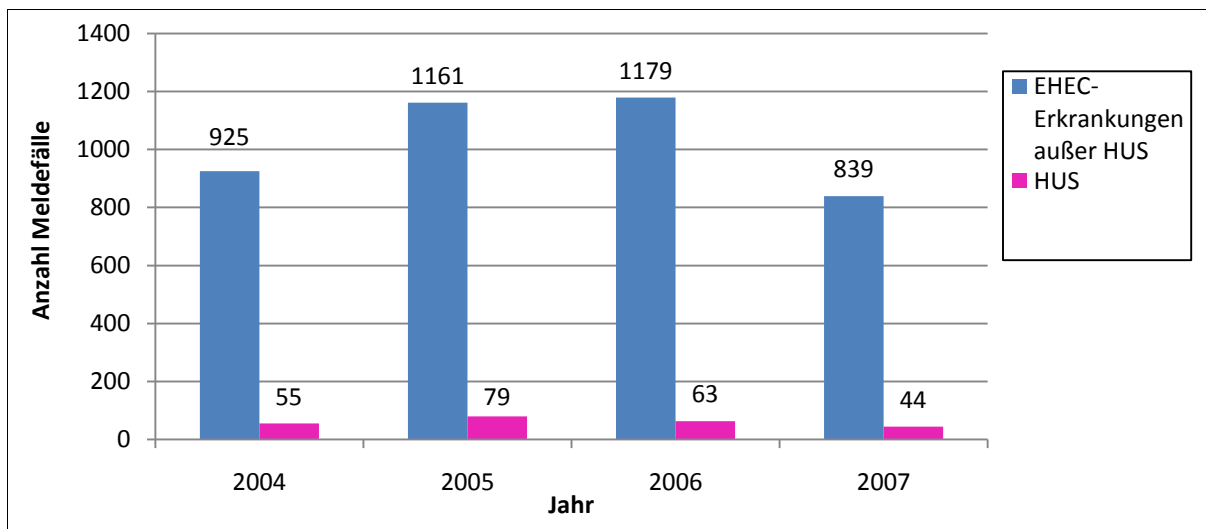


Abbildung 1: In Deutschland gemeldete Fälle an Erkrankungen mit EHEC bzw. HUS

Tabelle 17: Ausbrüche von EHEC-Infektionen in Europa

Land	Zusammenhang Vektor ¹⁾	Serogruppe/-typ	DF/HC (%)	HUS/TTP (%)	Tote (%)	Quelle
B ²⁾	Speiseeis	O145 & O26	12	5 (41,7)	0	DE SCHRIJVER et al., 2008
DK ³⁾	Biomilch, „person-to-person“	O157:H ⁻	24	0	k.A. ⁴⁾	JENSEN et al., 2006
	Wurst aus Rindfleisch	O26:H11	20	0	0	ETHELBERG et al., 2007
E ⁵⁾	Urlaub; rohes Gemüse/ Wasser	O157	15	3 (20,0)	k.A.	PEBODY et al., 1999
F ⁶⁾	Hochzeitsfeier; gerösteter Hammel	O148:H8	10	2 (20,0)	0	ESPIE et al., 2006
GB ⁷⁾	Musikfestival; Schlamm	O157	7	1 (14,3)	0	CRAMPIN et al., 1999
	Farmfestival; Speiseeis/ Zuckerwatte	O157	24	3 (12,5)	0	PAYNE et al., 2003
F ⁸⁾	Schülergruppe; Gurkensalat	O157	10	0	0	DUFFELL et al., 2003
I ⁹⁾	unklar	O111	k.A.	9	1 [11,1]	CAPRIOLI et al., 1994
IRL ¹⁰⁾	Trinkwasser; „person-to-person“	O157	9	2 (22,2)	0	MANNIX et al., 2007
N ¹¹⁾	Rinderhackfleisch	vermutlich O103	7	7	k.A.	SCHIMMER et al., 2006
	geräucherte Hammelwurst	O103:H25	16	10 (62,5)	1 (6,3)	SCHIMMER et al., 2008
NL ¹²⁾	rohes Tatarbeefsteak/ rohes Gemüse	O157	31	k.A.	k.A.	DOORDUYN et al., 2006
	Eisbergsalat	O157	35	0	k.A.	FRIESEMA et al., 2007
S ¹³⁾	Eisbergsalat	O157	120	7 (5,8)	k.A.	SÖDERSTRÖM et al., 2005
	„dry fermented sausage“	O157:H7	36	12 (33,3)	k.A.	SARTZ et al., 2008

¹⁾ teilweise nur vermutet²⁾ Belgien³⁾ Dänemark⁴⁾ keine Angabe⁵⁾ Spanien⁶⁾ Frankreich⁷⁾ Großbritannien⁸⁾ Schülergruppe aus England in Frankreich⁹⁾ Italien¹⁰⁾ Irland¹¹⁾ Norwegen¹²⁾ Niederlande¹³⁾ Schweden

[] bezogen auf HUS-Fälle

Tabelle 18: Ausbrüche von EHEC-Infektionen außerhalb Europas

Land	Zusammenhang Vektor ¹⁾	Serogruppe/-typ	DF/HC (%)	HUS/TTP (%)	Tote (%)	Quelle
	Altersheim	O157:H7	73	k.A. ³⁾	17 (23,3)	KRISHNAN et al., 1987
	LM; „person-to-person“	O157:H7	521	22 (4,2)	2 (0,4)	ORR et al., 1994
CDN ²⁾	„Genoa“-Salami	O157:H7	29	2 (6,9)	k.A.	WILLIAMS et al., 2000
	Trinkwasser	O157:H7	1346	27 (2,0)	6 (0,4)	PHAC, 2000 WOODWARD et al., 2002
	Salami	O157	143	6 (4,2)	0	MAC DONALD et al., 2004
J ⁴⁾	kontaminierte LM; „person-to-person“	O26:H11	32	0	k.A.	HIRUTA et al., 2001
RA ⁵⁾	„person-to-person“	O103:H2 & O26:H11	15	1 (6,7)	0	GOMEZ et al., 2005
	Badensee	O121	11	3 (27,3)	0	MC CARTHY et al., 2001
USA ⁶⁾	Gebäudeoberflächen	O157:H	23	2 (8,7)	0	VARMA et al., 2003
	Cheerleading-Camp; Salat, Speiseeis	O111:H8	55	2 (3,6)	0	BROOKS et al., 2004
USA & CDN ⁷⁾	Badewasser	O157:H7	37	3 (8,1)	0	BRUCE et al., 2003

¹⁾ teilweise nur vermutet²⁾ Kanada³⁾ keine Angabe⁴⁾ Japan⁵⁾ Argentinien⁶⁾ Vereinigte Staaten von Amerika⁷⁾ Vereinigte Staaten von Amerika und Kanada

2.4.3.2 Krankheitsbild

EHEC-Infektionen resultieren vorwiegend bei Kindern und älteren Menschen in **lebensbedrohlichen Erkrankungen** (BEUTIN und NIEMER, 1995), wobei die Inkubationszeit zwei bis acht Tage beträgt (AFZA et al., 2006). Die Betroffenen sind klinisch symptomlos oder weisen abdominale Schmerzen und eine diarrhöische Erkrankung auf, die durch den Verotoxin-bedingten Gewebeschaden zu profusen Blutungen oder zu Hämorrhagischer Colitis (HC) führen kann. HC ist durch starke Bauchschmerzen und –krämpfe, erst wässrige, später blutige Diarrhö und in seltenen Fällen Fieber charakterisiert. In nahezu 50 % der Fälle tritt

zusätzlich Erbrechen auf (RILEY et al., 1983; BEUTIN et al., 1994; BEUTIN und NIEMER, 1995; ANDREOLI et al., 2002). Ohne weitere Komplikationen ist die Erkrankung nach sechs bis 10 Tagen ohne spezifische Therapie überstanden (BEUTIN et al., 1994). Bei etwa 5 % (AFZA et al., 2006), 10 % (ANDREOLI et al., 2002) bzw. bis zu 20 % (BEUTIN et al., 1994) der Patienten, vor allem bei Kindern unter 10 Jahren und bei älteren Menschen, kommt es etwa drei bis 12 Tage nach der Ansteckung zum Auftreten des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS). HUS ist symptomatisch durch mikroangiopathische hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und Nephropathie mit Hämaturie und Proteinurie charakterisiert. In ca. 50 % dieser Erkrankungsfälle treten Oligurie oder Anurie zu Tage, und die Dialyse wird unumgänglich. Bei 10-30 % der Betroffenen resultiert eine Niereninsuffizienz mit lebenslanger Dialysepflicht, und in etwa 10 % der Fälle endet die Erkrankung mit dem Tod des Patienten (BEUTIN et al., 1994; BEUTIN, 1996; BEUTIN und NIEMER, 1995). Weitere mögliche **Komplikationen** bei Erwachsenen sind die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) mit schweren neurologischen Symptomen (GRIFFIN und TAUXE, 1991; AFZA et al., 2006). TTP ist ein dem HUS nahe verwandtes Syndrom, welches sich jedoch durch die neurologischen Auswirkungen, den höheren Altersmedian und häufiger auftretendes Fieber unterscheidet (KARMALI, 1989; OSTROFF et al., 1990). Die **Ausscheidungsdauer** der pathogenen Erreger beträgt meist fünf bis 20 Tage, kann aber vor allem bei Kindern auch mehrere Monate andauern. Dabei fungieren symptomlose Ausscheider häufig als Infektionsquelle. Ebenso kann es aber auch zur frühzeitigen Elimination der Erreger kommen, so dass sie zum Zeitpunkt des Auftretens von HUS und TTP im Untersuchungsmaterial nicht mehr nachweisbar sind. Aus diesem Grund wird eine frühe mikrobiologische Untersuchung von durchfallkranken hospitalisierten Kindern empfohlen, in deren Umgebung die genannten Erkrankungen oder wässrige bzw. blutige Durchfälle aufgetreten sind (RKI und BGVV, 2001).

2.4.3.3 Pathogenese

Die Infektionsdosis ist sehr gering und liegt bei unter 100 Zellen für EHEC O157 (BEUTIN und NIEMER, 1995; RKI und BGVV, 2001; BfR, 2005; RKI, 2008a). Die erforderliche Zellzahl liegt damit unter derjenigen für eine Salmonellen-Infektion (GRIFFIN und TAUXE, 1991). EHEC besitzen die Fähigkeit, in sauren pH-Bereichen zu überleben, wodurch sie nach der oralen Aufnahme die Magenpassage unbeschadet überstehen und auch in geringer

Zellzahl eine Infektion auszulösen imstande sind (BEUTIN und NIEMER, 1995; PATON und PATON, 1998; RKI und BGVV, 2001). Die sich anschließende Kolonisierung des Darms, hauptsächlich des Colons und des distalen Dünndarms, erfolgt durch Anheftung an die Epithelzellen. Es werden verschiedene Erscheinungsformen der Anheftung beschrieben, wobei die am besten charakterisierte Form bei LEE-positiven-Stämmen auftritt und zu den typischen „attaching and effacing“-Läsionen führt (Abhandlung in Kapitel 2.3.3). Nach der Koloniesierung migrieren die ins Darmlumen sezernierten Verotoxine transzellulär durch das intestinale Epithel und gelangen in die darunterliegenden Gewebe, wie auch in die Blut- und Lymphbahn. Mit Blut oder Lymphe werden diese zu den mit spezifischen Gb₃-Rezeptoren ausgestatteten Zielzellen transportiert, wodurch die lokalen (Zelltod durch Hemmung der Proteinbiosynthese) und systemischen (HC und HUS) Auswirkungen in Erscheinung treten (PATON und PATON, 1998; BfR, 2005).

2.4.3.4 Beteiligte EHEC-Stämme

Serogruppen und -typen

EHEC des Serotyps O157:H7 und O157:H⁻ gelten als Stämme mit besonders hoher Virulenz für den Menschen (BEUTIN et al., 1994). Ferner wird anhand von Studien geschlossen, dass die Serogruppe O157 hauptsächlich für das Auftreten von HUS verantwortlich ist (KARCH et al., 1997). Im Gegensatz zu O157:H7-VTEC fermentieren O157:H⁻-Stämme Sorbitol, zeigen β -D-Glucuronidase-Aktivität, sind unbeweglich und weisen nur das *vtx2*-Gen auf. Ergänzend besteht die Vermutung, dieser Serotyp könne der virulenteste aller bekannten VTEC-Serovare sein. In Europa ist für das Vorkommen von HUS durch Sorbitol-fermentierende (SF) O157:H⁻-VTEC eine steigende Bedeutung zu sehen. In den untersuchten Tierspezies, worin auch die - wie bereits dargelegt - als Reservoir für O157:H7 geltenden Wiederkäuer mit einbezogen waren, kann diese Serovar dagegen nur sehr selten bis gar nicht nachgewiesen werden. Auf Basis dieser Gesichtspunkte kommen verschiedene Autoren zu der Annahme, dass der Mensch als Reservoir dient (KARCH und BIELASZEWSKA, 2001; RKI, 2004; KARCH et al., 2005). Andere häufig bei Menschen ermittelte EHEC-Serogruppen sind O26, O91, O103, O111, O113, O118, O121 und O145 (BEUTIN, 1995; KARCH et al., 1997; FRIEDRICH et al., 2002; GERBER et al., 2002; BROOKS et al., 2005; BIELASZEWSKA et al., 2007; EFSA, 2007; RKI, 2008a). Non-O157-EHEC führen seltener zu blutiger Diarrhö und HUS als O157-Stämme (KARCH et al., 1997; JELACIC et al., 2003; WERBER et al., 2007), sondern lösen

hauptsächlich wässrige Diarrhö aus (KARCH et al., 1997). VERWEYEN et al. (1999) verifizierten jedoch bei unter dreijährigen Kindern am häufigsten non-O157:H7 als Auslöser für HUS. Tatsächlich werden non-O157:H7 aufgrund diagnostischer Einschränkungen und inadäquater Überwachung vielfach unterschätzt (MC CARTHY et al., 2001; BÜLTE, 2002; WOODWARD et al., 2002; BROOKS et al., 2005). Als Fazit dieses Aspektes wird die Prüfung von non-O157:H7-Stämmen empfohlen, wenn Symptome wie blutige Diarrhö, HUS oder schmerzhafter unblutiger Durchfall vorliegen und keine typischen Darmpathogene wie *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7, Salmonellen, Shigellen oder Yersinien feststellbar sind (KARCH et al., 1997).

Verotoxine

Das Krankheitsbild der blutigen Diarrhö und des HUS kommt laut Untersuchungen häufiger bei mit VT 2-positiven Stämmen infizierten Kindern vor, als bei der Ansteckung mit VTEC, die VT 1 und VT 2 oder nur VT 1 bilden (OSTROFF et al., 1989; JELACIC et al., 2002; BROOKS et al., 2005). Darüber hinaus berichteten BOERLIN et al. (1999) über eine offensichtliche Korrelation zwischen humanen Stämmen mit VT 2-Bildungsvermögen und der Schwere der Erkrankung bei Menschen. Diese Feststellung konnte jedoch bei non-O157:H7-VTEC zumindest für das Symptom der blutigen Diarrhö nicht bestätigt werden, da bei einem Drittel der Stämme von einbezogenen Patienten *vtx1*, nicht jedoch *vtx2* nachweisbar war (JELACIC et al., 2003). Untersuchungen von FRIEDRICH et al. (2002) ergaben, dass die Toxinvarianten VT 2d und VT 2e zu mildereren Infektionen führen, die mit einem geringeren Risiko einer HUS-Erkrankung einhergehen. Auch andere Autoren kamen durch ihre Studie zu der Ansicht, dass VT 2d-positive Stämme eine geringe Pathogenität für Menschen aufweisen, da solche Stämme seltener mit HUS- oder Diarrhö-Erkrankungen assoziiert waren (PIÉRARD et al., 1998; RAMACHANDRAN et al., 2001) bzw. die Variante *vtx2d* am häufigsten bei VTEC-Stämmen von asymptomatischen Trägern nachgewiesen werden konnte (STEPHAN und HOELZLE, 2000). Analog zu diesen Resultaten ermittelte BÜLTE (2001) bei keinem der 50 von ihm untersuchten, von HUS-Patienten isolierten VTEC-Stämme *vtx2d* und *vtx2e*. Die Detektionsrate von VT 2c erwies sich bei VTEC von HUS-Patienten und bei Durchfallkranken Menschen als gleich hoch, und auch der Nachweis von VT 2c, VT 2d und VT 2e bei Stämmen von asymptomatischen Trägern war vergleichbar zu der Situation bei Menschen mit Diarrhö. Bei keinem der VTEC-Stämme wurde der Subtyp VT 2f detektiert (FRIEDRICH et al., 2002). KAWANO et al. (2008) konnten desweiteren weder bei EHEC O157-Stämmen von

HUS-Betroffenen und von Personen mit blutiger bzw. wässriger Diarrhö, noch bei O157-Stämmen von asymptomatischen Trägern *vtx2d*, *vtx2e* oder *vtx2f* feststellen.

Von BIELASZEWSKA et al. (2007) durchgeführte Untersuchungen mit Stuhl von an HUS-erkrankten Personen ergaben, dass nicht alle dabei isolierten *E. coli*-Stämme das Verotoxin-Bildungsvermögen, sondern lediglich das *eae*-Gen besaßen. Bei diesen Stämmen wurde davon ausgegangen, dass sie ihre Verotoxin-Gene aufgrund des Verlusts von für *vtx*-codierenden Bakteriophagen während der Infektion eingebüßt hatten. Man kam zu dieser Schlußfolgerung, da die nachgewiesenen Serotypen bei diesen *vtx*-negativen Stämmen den Serotypen bei *vtx*-positiven EHEC-Stämmen, die von HUS-Patienten isoliert wurden, ähnlich waren, und sie den von an HUS-erkrankten Personen kultivierten *vtx*-positiven EHEC-Stämmen ähnliche sonstige Virulenzgene besaßen. Zudem war der chromosomale Locus für die Integration der *vtx*-tragenden Bakteriophagen in den untersuchten Stämmen unbesetzt. Weil solche Stämme durch auf VT- oder *vtx*-Vorkommen beruhenden Nachweismethoden nicht gefunden werden, rät die Arbeitsgruppe von BIELASZEWSKA et al. (2007) ebenso andere Untersuchungen (z.B. einen *eae*-Gen-Nachweis) durchzuführen. Durch eine solche Erweiterung könnten betroffene Patienten adäquater als potentielle EHEC-Infizierte eingestuft werden und entsprechend durch die behandelnden Ärzte versorgt werden (BIELASZEWSKA et al., 2007). Bereits in früheren Studien wurde demonstriert, dass EHEC das Verotoxin-Bildungsvermögen innerhalb relativ kurzer Zeit im menschlichen Wirt während einer Infektion verlieren können. Dieser Hintergrund veranschaulicht die Bedeutsamkeit der frühen Stuhlprobeentnahme bei HUS-Patienten, da bei späterer Testung der Nachweis von EHEC weniger häufig gelingt (MELLMANN et al., 2005).

***eae*-Gen**

Non-O157 VTEC-Stämme ohne **Intimin-Bildungsvermögen** werden selten bei schwerwiegenden humanen Erkrankungen, sondern vorwiegend bei gesunden Individuen nachgewiesen (BOERLIN et al., 1999; PATON et al., 1999). Es wurde daher geschlussfolgert, dass EHEC ohne *eae*-Gen weniger virulent für den Menschen sind als die sogenannten „klassischen“ EHEC (BEUTIN et al., 1996), und zudem ein starker Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des *eae*-Gens und der Schwere der humanen Erkrankung vorliegt (BOERLIN et al., 1999). Nichtsdestotrotz ist die Intimin-Produktion nicht zwingend für eine Erkrankung notwendig, denn vereinzelte HUS-Fälle wurden durch *eae*-negative non-O157 EHEC-Stämme hervorgerufen (PATON et al., 1999). BROOKS et al. (2005) brachten bei non-O157 EHEC-

Stämmen weiterhin das *eae*-Gen-Vorkommen mit einem gesteigerten Risiko für die Entstehung einer blutigen Diarrhö in Zusammenhang.

Enterohämolysin

Häufig kann bei EHEC-Stämmen Enterohämolysin nachgewiesen werden (BEUTIN et al., 1996). BOERLIN et al. (1999) sind jedoch der Ansicht, experimentelle Beweise für die Virulenz von Enterohämolysin fehlten noch, und in Folge dessen sei dieses nur als vermeintlicher Virulenzfaktor anzusehen. SCHMIDT et al. (1995) weisen dagegen aufgrund des hohen Vorkommens in EHEC-Stämmen auf den möglichen Zusammenhang zwischen Enterohämolysin- und Verotoxin-Bildungsvermögen und der Pathogenese von HC und HUS hin, wobei die Ergebnisse der auf dieser Thematik beruhenden Untersuchungen divergieren (SCHMIDT und KARCH, 1996; BÜLTE, 2001; LEOTTA et al., 2008).

2.4.3.5 Übertragung und Risikofaktoren

Der **Infektion des Menschen** über den direkten Kontakt zu Wiederkäuern wird eine immense Bedeutung zugesprochen. Dementsprechend gelten Rinder als Hauptinfektionsquelle, wohingegen vom Tier stammende Lebensmittel wie Rohmilch, ungenügend erhitztes Rind- oder Lammfleisch und Rohwurst ein geringeres Gefährdungspotential darzustellen scheinen. Zu den wesentlichen Übertragungswegen zählen auch die Weitergabe von Mensch zu Mensch, ebenso wie über Rinderkot mit VTEC kontaminiertes Trink- und Badewasser sowie Obst und Gemüse (CHAPMAN et al., 1993; BEUTIN et al., 1994; ARMSTRONG et al., 1996; BÜLTE, 2001; RKI und BGVV, 2001; BÜLTE, 2002; BRUCE et al., 2003; WERBER et al., 2007). Mögliche Infektionswege sind in Abbildung 2 (in Anlehnung an ARMSTRONG et al., 1996 und BÜLTE, 2002) veranschaulicht.

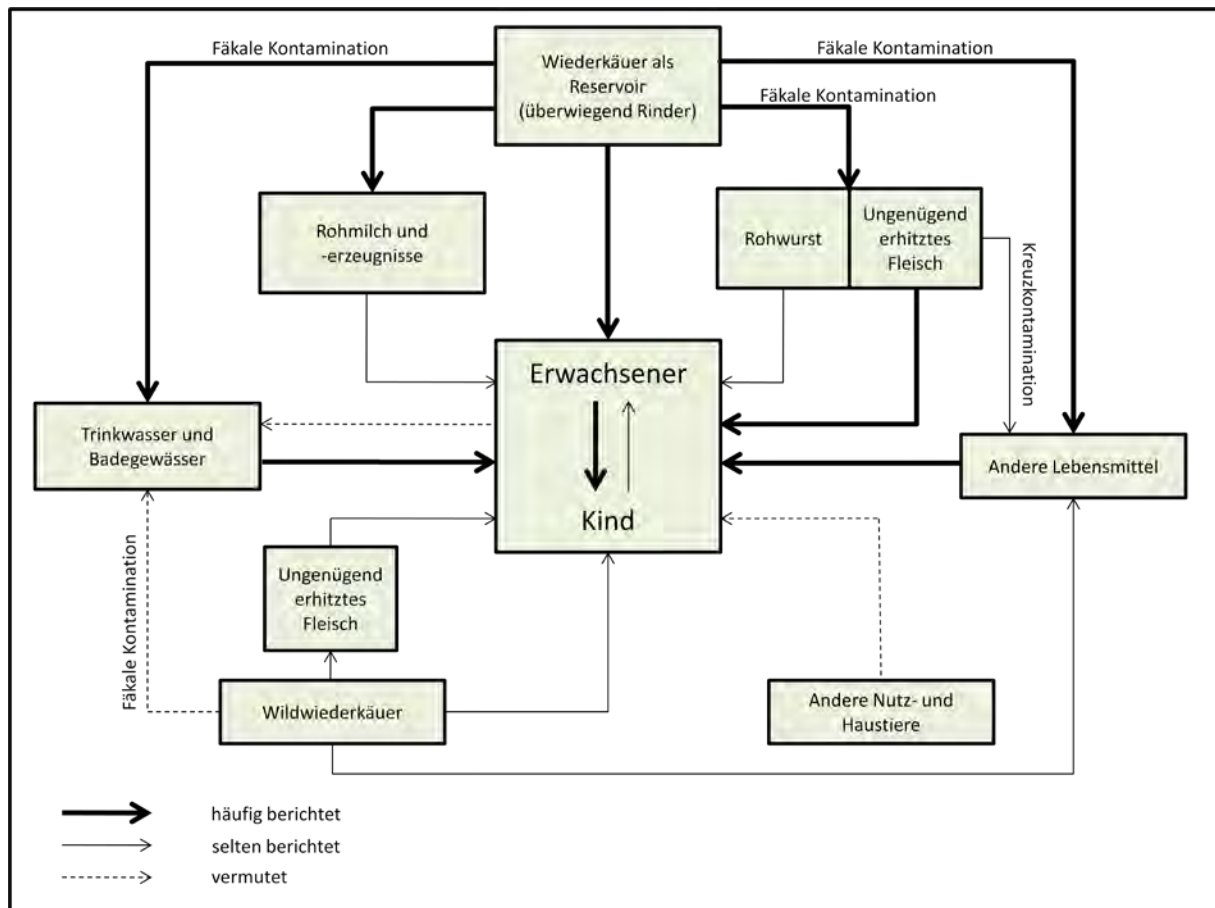


Abbildung 2: Mögliche Übertragungswege von und Risikofaktoren für VTEC-Infektionen (in Anlehnung an ARMSTRONG et al., 1996 und BÜLTE, 2002)

Der Verzehr von Rohmilch und ungenügend erhitztem Rind- oder Lammfleisch ist folglich Risikogruppen, den sogenannten „YOPIS“ (young, old, pregnant and immune-compromised segments), nicht zu empfehlen (BÜLTE und HECKÖTTER, 1997; RKI und BGVV, 2001; DOORDUYN et al., 2006).

In einer bundesweiten Fall-Kontroll-Studie des RKI erwies sich das Spielen im Sandkasten als weiterer möglicher Risikofaktor sowohl für Kinder unter drei Jahren als auch für Kinder von drei bis neun Jahren (RKI, 2004); dieses wurde auch mittels weiterer Untersuchungen bestätigt (WERBER et al., 2007). Die Transmissionswege und -faktoren von SF O157:NM sind dagegen häufig nicht bekannt, jedoch wurden kontaminierte Lebensmittel und Tierkontakt als Auslöser ermittelt; allerdings wird die Übertragung von Mensch zu Mensch als Hauptübertragungsweg angenommen (ref. in KARCH und BIELASZEWSKA, 2001). Darüber hinaus wies das RKI bestimmte Transmissionswege für sporadische EHEC-Infektionen hinsichtlich der Altersabhängigkeit nach. So ergab sich bei unter dreijährigen Kindern der

direkte Kontakt zu Wiederkäuern als höchster Risikofaktor, gefolgt von Rohmilchkonsum und der Anwesenheit eines durchfallkranken Familienmitgliedes. Bei über 10-jährigen war der Konsum von kontaminierten Lebensmitteln als wichtigster Infektionsweg feststellbar (RKI, 2004; RKI, 2008a).

2.5 Therapie bei vorliegenden EHEC-Infektionen

2.5.1 Antimikrobielle Chemotherapeutika

In der Literatur sind verschiedene Ansichten über die Therapie von EHEC-Erkrankungen mit **antimikrobiellen Chemotherapeutika** dargestellt. Während einige Autoren von einer antibiotischen Behandlung abraten (RKI und BGVV, 2001; MELLMANN et al., 2005; TARR et al., 2005) und teilweise sogar bei Verwendung einiger Wirkstoffe von einer erhöhten Gefahr für die Entstehung eines HUS bei Kindern (SLUTSKER et al., 1998; IGARASHI et al., 1999; WONG et al., 2000) und Erwachsenen (DUNDAS et al., 2001) ausgehen, sind andere Autoren der Ansicht, die Anwendung habe gar keine Auswirkungen (PROULX et al., 1992; BELL et al., 1997). Wieder andere vertreten die Meinung, eine frühe Verabreichung bestimmter antimikrobieller Substanzen könne das Fortschreiten der Erkrankung verhindern (TAKEDA et al., 1997 – zitiert in AHMED et al., 2005; FUKUSHIMA et al., 1999a; SHIOMI et al., 1999). Bei der Beurteilung dieser Medikamente als mögliche Risikofaktoren für die Entstehung eines HUS bei mit EHEC infizierten Kindern muss bedacht werden, dass der Schweregrad der Erkrankung häufig mit der Anwendung von antimikrobiellen Substanzen in Zusammenhang steht, und daher ein schwerer Krankheitsverlauf nicht mit einer Gefahr durch Antibiotika-Behandlungen gleichzusetzen ist. Dies soll bedeuten, dass ein besonders schwerwiegender Verlauf der Erkrankung nicht immer den antimikrobiellen Wirkstoffen anzurechnen ist, da diese Pharmaka oftmals nur in solchen Fällen zum Einsatz kommen, und das Krankheitsgeschehen möglicherweise ohnehin in diesem Maß verlaufen wäre (WONG et al., 2000).

Als Gründe für die häufige Ineffektivität antimikrobieller Chemotherapeutika bei der Behandlung von EHEC-Infektionen werden drei Vorgänge vermutet. Als erste Ursache ist die Eliminierung nützlicher Darmbakterien durch eingesetzte antimikrobielle Wirkstoffe und die sich möglicherweise anschließende gesteigerte Vermehrung der pathogenen Bakterien,

insbesondere bei Vorliegen von Resistenzen, anzusehen. Der zweite negative Mechanismus ist die erhöhte Freisetzung der Verotoxine durch Zerstörung der Bakterienzellen (ref. in PATON und PATON, 1998 und PANOS et al., 2006), und als dritte mögliche Ursache wird die erhöhte Verotoxinproduktion aufgrund der Anregung von für VT codierenden Bakteriophagen nach dem Einsatz bestimmter antimikrobieller Substanzen (KIMMITT et al., 2000; ZHANG et al., 2000) wie DNA schädigende-Therapeutika (z.B. Fluorchinolone und Cotrimoxazol) in Betracht gezogen. Von Bedeutung ist, dass die genannten Antibiotika bei der Behandlung von durchfallkranken Kindern und Erwachsenen zum Einsatz kommen (ZHANG et al., 2000; ANDREOLI et al., 2002).

Wiederholt wurde der Einsatz antimikrobieller Chemotherapeutika *in vitro* und im **Mäusemodell** getestet, wobei unterschiedliche Ergebnisse zu Tage traten. Bei einzelnen Untersuchungen erwiesen sich die Kombinationen von Makroliden und Lincosamiden (MURAKAMI et al., 2000) bzw. von Imipenem (im Vergleich zu Cefazidim) als hilfreich gegen EHEC-Infektionen (TAKAHASHI et al., 1997). Das Fazit einer anderen *in vitro*-Studie war, dass subinhibitorische Konzentrationen von Chinolonen die VT 1- und VT 2-Produktion stimulieren, während verschiedene Konzentrationen von Makroliden keinen solchen Effekt bewirken (YOH et al., 1999). Aus weiteren Erhebungen wurde geschlossen, dass DNA-schädigende Antibiotika wie Chinolone, Trimethoprim und Furazolidon in Konzentrationen über der minimalen Hemmkonzentration (MHK) die Transkription von *vtx2*-Genen bei einem *E. coli* O157:H7-Stamm induzieren und daher bei humanen Betroffenen mit möglicher oder nachgewiesener EHEC-Infektion nicht eingesetzt werden sollten (KIMMITT et al., 2000). Weiterhin fanden ITO et al. (1997) heraus, dass die Proteinsynthese inhibierende Mittel wie Kanamycin und Tetrazykline die Entstehung von HUS oder TTP verhindern können. Die Arbeit von GRIF et al. (1998) brachte schließlich hervor, dass die Auswirkungen des Einsatzes subinhibitorischer Antibiotika-Konzentrationen vom jeweiligen Stamm abhängig sind, was eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der anderen *in vitro*-Studien in Bezug auf die Toxin-Freisetzung darstellt (SAFDAR et al., 2002).

Einige japanische Arbeiten brachten im Mäusemodell, insbesondere bei frühzeitiger Anwendung von Fosfomycin, Fluorchinolonen und Kanamycin, aber auch von Ampicillin, Clarithromycin und Minozyklin, eine Verringerung des Verotoxin-Vorkommens in Blut und Kot sowie eine Reduzierung der Mortalitätsrate hervor (KURIOKA et al., 1999; SAWAMURA et al., 1999; YOSHIMURA et al., 1999). Dagegen führte der zu einem späteren Zeitpunkt stattfindende Einsatz des Kombinationspräparates Cotrimoxazol zu einem höheren

Toxinpegel und damit auch zu einer vermehrten Sterblichkeit bei Mäusen (KURIOKA et al., 1999). ZHANG et al. (2000) stellten abweichend zu den genannten japanischen Studien auch nach der Anwendung des Fluorchinolons Ciprofloxacin bei mit *E. coli* O157:H7 infizierten Mäusen eine Induktion der VT-codierenden Prophagen und somit eine verstärkte intrainestinale VT-Produktion, eine vermehrte VT-codierende Phagen-Transmission und den Tod eines Teils der behandelten Mäuse fest und raten somit ebenso wie KIMMITT et al. (2000) von der Verwendung Bakteriophagen-induzierender Antibiotika bei VTEC-Infektionen ab. Stattdessen wird bei vorliegender Indikation zur Antibiotika-Therapie während einer EHEC-Infektion die Behandlung mit Inhibitoren der Zellwandsynthese (z.B. Fosfomycin) oder der Proteinsynthese (z.B. Makrolide) vorgezogen (ZHANG et al., 2000). Viele *in vitro*- und Mäuse-Studien weisen auf die große Bedeutung des Anwendungszeitpunktes und der –dauer antimikrobieller Chemotherapeutika sowie der verwendeten Wirkstoffklasse hin (SAFDAR et al., 2002).

Vergleichbar unterschiedliche Resultate wie bei *in vitro*- und Mäuse-Versuchen ergaben auch **klinische Studien**. Die Durchführung klinischer Erhebungen in Bezug auf die Wirkung von Antibiotika bei humanen EHEC-Infektionen wird jedoch durch vorliegende Resistenzen noch erschwert (FARINA et al., 1996).

Während des großen EHEC O157-Ausbruchs in Sakai City (Japan) im Jahr 1996 wurde allen 425 hospitalisierten Kindern zu einem frühen Zeitpunkt Fosfomycin verabreicht. Bei 12 dieser Kinder entwickelte sich ein HUS, wobei sie alle wieder rekonvaleszierten und keine schwerwiegenden Folgen zurückblieben. Hierdurch schlussfolgerten die Autoren, dass eine frühe intensive antibiotische Behandlung das Risiko der Entwicklung eines HUS vermindere und gleichzeitig bei Zustandekommen dieser Erkrankung die Symptome und möglichen Folgen verbessere. Zusätzlich habe die frühe intensive Gabe bakterizider Therapeutika den Vorteil, dass die Erreger schnell eliminiert und Sekundärinfektionen verhindert werden könnten (FUKUSHIMA et al., 1999a). Bei dieser Studie wurde jedoch kritisiert, dass alle hospitalisierten Kinder mit Antibiotika behandelt wurden und so kein Vergleich mit unbehandelten Patienten gezogen werden konnte (ZIMMERHACKL, 2000). Innerhalb der EU findet der verwendete Wirkstoff Fosfomycin keine Anwendung (EFSA, 2008). Analog zu FUKUSHIMA et al. (1999a) unterstreichen SHIOMI et al. (1999) den positiven Effekt der frühzeitigen Anwendung und einer ausreichenden Konzentration von Fluorchinolonen bei humanen EHEC-Infektionen. Die Metaanalyse von neun Studien ergab ebenfalls keine Assoziation in Bezug auf die Verabreichung von Antibiotika und der Entwicklung eines HUS

(SAFDAR et al., 2002), wobei diese Arbeit häufig kritisiert wurde (THORPE, 2004; TARR et al., 2005). Im Gegensatz zu den genannten Auffassungen vertreten andere Arbeitsgruppen den Standpunkt, die frühzeitige Anwendung von Antibiotika bei Kindern könne mit HUS in Zusammenhang gebracht werden und warnen daher vor dem Gebrauch dieser Medikamente bei mit EHEC infizierten Kindern (SLUTSKER et al., 1998; IGARASHI et al., 1999). Die Anwendung von antimikrobiellen Substanzen (Cotrimoxazol, Cephalosporinen und Amoxicillin) bei 10 durch *E. coli* O157:H7 an Durchfall erkrankten Kindern unter 10 Jahren während einer Studie von WONG et al. (2000) führte bei fünf dieser Patienten zu HUS, wohingegen von 62 nicht mit antimikrobiellen Chemotherapeutika behandelten Kindern lediglich fünf an diesem Syndrom erkrankten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Fazit gezogen, dass antibiotisch behandelte, mit *E. coli* O157:H7-infizierte Kinder häufiger HUS entwickeln als nicht mit diesen Präparaten therapierte Patienten, und antimikrobielle Wirkstoffe aus diesem Grund bei Infektionen mit diesem Pathogen kontraindiziert sind. Zu der gleichen Schlussfolgerung kamen DUNDAS et al. (2001) im Bezug auf die Behandlung von mit *E. coli* O157:H7-infizierten Erwachsenen.

Zusammenfassend scheint nun gesichert zu sein, dass die Verabreichung von Antibiotika bei vorliegender möglicher VTEC-Infektion bei Erwachsenen und Kindern vermieden werden sollte (WONG et al., 2000; ZIMMERHACKL, 2000; DUNDAS et al., 2001; TODD und DUNDAS, 2001). Dagegen bleibt allerdings hervorzuheben, dass durch *E. coli* (EIEC, EPEC, ETEC und **EHEC**) ausgelöste Magen-Darm-Infektionen ausnahmsweise bei jungen Säuglingen und immundefizienten Patienten sowie bei Verdacht auf eine systemische Infektion antibakteriell (mit Aminopenicillinen oder einer Sulfonamid/Trimethoprim-Kombination) zu behandeln sind (SCHOLZ et al., 2002). Neben Antibiotika ist bei humanen EHEC-Infektionen ein Verzicht auf Peristaltik-hemmende Medikamente, Betäubungsmittel sowie Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) angezeigt, da auch diese zu einem erhöhten HUS-Risiko führen können (BELL et al., 1997; TARR et al., 2005).

2.5.2 Alternative Therapiemethoden

Da eine antibiotische Behandlung nur mit äußerster Vorsicht als Therapie für EHEC-Infektionen angewandt werden sollte, ist die Entwicklung **therapeutischer Alternativen** dringend erforderlich (NERI et al., 2007). In Betracht kommende alternative Therapeutika

stellen Verotoxin-bindende und -blockierende Mittel dar, welche den durch die Toxine ausgelösten Zelltod unterbinden und demzufolge ein HUS verhindern bzw. den Ausgang eines bereits bestehenden HUS verbessern können. Das terminale Trisaccharid des Gb₃-Rezeptors, an welches die B-Untereinheiten der Verotoxine binden, ist aufgrund des in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Aufbaus des Holotoxins für die Gestaltung der Toxin-bindenden Mittel von Bedeutung. In diesem Zusammenhang sind drei bedeutsame Ansatzpunkte zu nennen. Dabei handelt es sich zunächst um synthetische Toxin-bindende Mittel, weiterhin um probiotische Bakterien, die das Trisaccharid des Gb₃-Rezeptors auf ihrer Oberfläche tragen und schließlich um monoklonale Antikörper, die gegen Verotoxine gerichtet sind (MAC CONNACHIE und TODD, 2004).

Zu den **synthetischen Mitteln** ist das oral einzunehmende Synsorb-Pk zu rechnen (SYNSORB Biotech Inc., Calgary, Alberta, Kanada). Ein von TRACHTMAN et al. (2003) durchgeführter Ringversuch mit diesem VT 1- und VT 2-bindenden Präparat ergab jedoch keine Verbesserung des Erkrankungsverlaufs. Ein möglicher Grund hierfür besteht in dem Umstand, dass die Patienten bereits ein HUS entwickelt hatten und somit nicht mehr von der Toxinbindung im Darmlumen profitieren konnten (MAC CONNACHIE und TODD, 2004). WATANABE et al. (2004) beschreiben die Entwicklung eines Gb₃-Polymers mit in hohem Maß gebündelten Trisacchariden, welches ebenfalls beide Toxintypen im Darm binden und somit inhibieren kann, weiterhin bei Mäusen gute Effekte zeigt und zudem eine 100.000-fach höhere Affinität besitzt als Synsorb-Pk. Andere bei Mäusen wirksame synthetische Mittel sind vorhanden, wobei die Testung der Wirksamkeit und Sicherheit bei Menschen noch aussteht (ref. in MAC CONNACHIE und TODD, 2004). Eine Verbesserung des Verlaufs eines HUS können diese Präparate allerdings nicht bewirken, da freie fäkale Toxine bei HUS-Patienten gering sind (IJIMA et al., 2008). Im Jahr 2002 wurde die Entwicklung von SUPER TWIG offenbart, einem Verotoxin-Neutralisierer, welcher in der Lage ist, im Blutkreislauf vorkommende Verotoxine mit hoher Affinität zu binden und so den letalen Effekt bei Mäusen zu verhindern (NISHIKAWA et al., 2002). Zusätzlich wurde erst kürzlich die Verotoxin-Neutralisierungsaktivität von synthetisch (mit Polyacrylamid als Basis) konjugiertem Globotriaosyl (Gb₃), Galabiosyl (Gb₂) und Galactotrehalose untersucht. Das Gb₂-nachahmende Galactotrehalose-Copolymer könnte nach Ansicht der Autoren mit einer Modifikation für die Aktivität gegen VT 2 zu einem führenden Präparat für Verotoxin-vermittelte Erkrankungen werden. Die beste neutralisierende Wirkung bewies jedoch das Gb₃-Polymer, da die Inhibierung der Toxizität im Blutkreislauf vorkommender Verotoxine

aufgezeigt werden konnte. In Kombination mit dieser Art von Präparaten wäre ein ungefährlicherer Einsatz von Antibiotika somit möglich (NERI et al., 2007).

Als **probiotisches Bakterium** gilt der von PATON et al. (2000) mit einem Plasmid von *Neisseria* rekombinierte *E. coli*-Stamm. Dieser bildet ein modifiziertes Lipopolysaccharid, welches den Verotoxin-Rezeptor nachahmt und somit Verotoxine mit hoher Effektivität binden und neutralisieren kann. Dieses probiotische Bakterium wurde bei Mäusen getestet, ist jedoch nicht für Versuche beim Menschen geeignet, da es sich um einen pathogenen Stamm handelt und das Plasmid zudem ein Kanamycin-Resistenzgen trägt, welches an andere Darmbakterien weitergegeben werden könnte. Daraufhin wurde ein nicht-pathogener *E. coli*-Stamm eingesetzt, welcher sich als ebenso wirkungsvoll bei Mäusen erwies, so dass dieser auch bei Menschen getestet werden könnte (PINYON et al., 2004). Solche rekombinanten Bakterienstämme besitzen eine 10.000-fach größere Bindungsaffinität zu Verotoxinen als Synsorb-Pk, müssten aber wie die synthetischen Präparate ebenfalls im frühen Stadium der Erkrankung verabreicht werden (MAC CONNACHIE und TODD, 2004).

Die Entwicklung von humanen **monoklonalen Antikörpern** gegen die A- und B-Untereinheiten von VT 1 und VT 2 als mögliche passive immunotherapeutische Mittel zur Prävention bzw. Behandlung von HUS wurden von MUKHERJEE et al. (2002a+b) hervorgehoben. Die Effektivität dieser Antikörper konnte bei Mäusen durch verlängertes Leben (MUKHERJEE et al., 2002a+b) und bei gnotobiotischen Ferkeln durch längeres Überleben sowie die Verhinderung von kranialen Läsionen und fatalen neurologischen Erkrankungsanzeichen bei sechs- bis 12-stündiger Gabe nach Infektion bewiesen werden (MUKHERJEE et al., 2002a). Es wurde herausgefunden, dass gegen die A-Untereinheit von VT 2 gerichtete Antikörper (verglichen mit gegen die B-Untereinheit gerichteten Antikörpern) ein breiteres Aktivitätsspektrum haben und somit auch VT 2-Varianten mit einbeziehen. Zudem war im Mäusemodell aufzeigbar, dass sich einzelne monoklonale Antikörper bis zu 48 Stunden nach Anwendung verschiedener VT 2-Varianten als wirksam erweisen (SHEORAN et al., 2003), was die mögliche klinische Anwendbarkeit erhöht. Während gegen die A-Untereinheiten gerichtete Antikörper in der Lage sind, die Bindung an die Ribosomen der Zielzellen zu verhindern, vermögen gegen die B-Untereinheiten gerichtete Antikörper die Bindung des Toxins an den Zelloberflächenrezeptor zu unterbinden, so dass durch eine Mischung verschiedener monoklonaler Antikörper die Entstehung eines HUS nach VTEC-Infektion vermieden werden könnte. Darüber hinaus sind monoklonale Antikörper systemisch verabreichbar und so aufgrund der Bindung bereits systemisch vorkommender Toxine in der Behandlung eines schon bestehenden HUS erfolgreicher als Toxin-bindende

Mittel oder Bakterien, welche die Verotoxine lediglich im Darm binden (MAC CONNACHIE und TODD, 2004).

2.5.3 Anwendbare Therapien

Betroffene, die an EHEC-bedingter blutiger Diarrhö leiden, sind zu hospitalisieren, mit intravenöser Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution **symptomatisch zu behandeln** und auf die Entwicklung eines HUS zu beobachten (AKE et al., 2005; LODE et al., 2006; POLLOCK et al., 2007). Bei bereits vorliegendem HUS ist eine gewissenhafte, unterstützende Behandlung von Bedeutung. Bei anhaltender Nierenschädigung ist die Dialyse notwendig, und bei einigen Patienten, vor allem Risikopatienten, kann eine Plasmapherese helfen (FUKUSHIMA et al., 1999a). Nach wie vor gibt es jedoch keine validierte spezifische Therapie, um den Verlauf einer EHEC-Erkrankung zu verbessern (MAC CONNACHIE und TODD, 2004; KARCH et al., 2005; TARR et al., 2005; IJIMA et al., 2008). Es wurde zudem beschrieben, dass einige Ansätze wie die Gabe von Kortikosteroiden, Heparin, Aspirin, Dipyridamol und Urokinase/Streptokinase sowie die Anwendung von Plasmapherese, Plasmainfusion und Synsorb Pk in ihrer Wirkung nicht erfolgreich sind und daher heutzutage üblicherweise nicht in der Therapie verwendet werden (ref. in IJIMA et al., 2008). Stattdessen wird geraten, HUS-Betroffene sorgfältig auf Flüssigkeitsüberlastung zu prüfen und sowohl Flüssigkeitsbalance als auch Gewicht täglich zu kontrollieren (TARR et al., 2005). Allgemein gilt, dass die effektivste Form, ein HUS zu verhindern, die Vermeidung einer EHEC-Infektion ist (WONG et al., 2000; KARCH et al., 2005; TARR et al., 2005; IJIMA et al., 2008).

2.6 Wirkungsweise antimikrobieller Chemotherapeutika

Für die Wirkung der antimikrobiellen Chemotherapeutika sind heutzutage **vier maßgebliche Mechanismen** bekannt. Hierbei handelt es sich um die Hemmung der Zellwandsynthese (β -Lactame), die Störung der Permeabilität der Zytoplasmamembran, die Blockade der Proteinbiosynthese (Aminoglykoside, Tetracykline) und die Unterdrückung der Nukleinsäuresynthese (Fluorchinolone [Gyrasemmer]). Die Präparate werden in die **Wirkungstypen** Bakteriostase (Hemmung der Keimvermehrung) und Bakterizidie

(Keimzerstörung) eingeteilt. Hierbei wirken die Proteinsynthese blockierende Mittel meist bakteriostatisch, und Pharmaka, welche die Synthese der Zellwand oder die Permeabilität der Zytoplasmamembran stören, bakterizid. Zusätzlich erfolgt eine Einteilung der antimikrobiellen Wirkstoffe hinsichtlich ihres Wirkungstyps in drei Klassen. Unter diesem Gesichtspunkt sind Substanzen zu nennen, deren bakterizide Wirkung stark von der Konzentration abhängig ist (Aminoglykoside, Fluorchinolone) und andere, deren Bakterizidie vor allem zeitabhängig (und weniger konzentrationsabhängig) ist (die meisten β -Lactam-Antibiotika). Die dritte Klasse stellen bakteriostatisch wirkende Pharmaka dar, zu denen unter anderem die Tetracykline, Sulfonamide und Trimethoprim zu rechnen sind. Antimikrobielle Wirkstoffe, die gegen eine Vielzahl von Keimen wirken, sind als Breitband-Antibiotika zu bezeichnen. Die Wirkstärke eines antimikrobiellen Chemotherapeutikums wird durch die **minimale Hemmkonzentration (MHK)** angegeben. Unter MHK wird die geringste Konzentration eines antimikrobiellen Chemotherapeutikums verstanden, die *in vitro* das Wachstum eines Keimes zu verhindern vermag (MUTSCHLER et al., 2008).

2.6.1 Aminoglykoside

Den Aminoglykosiden sind Streptomycin sowie Antibiotika der Neomycin- und Kanamycin-Gentamicin-Gruppe (**Gentamicin**) zugehörig. Diese Substanzen besitzen eine tri- oder tetrasaccharidartige Struktur; als gemeinsamer Bestandteil sind Streptamin oder Streptamin-Derivate vorhanden. Die Molekulargewichte betragen zwischen 400 und 500 Dalton. Das Wirkungsspektrum dieser Pharmaka (außer Streptomycin) ist breit. Aminoglykoside weisen einen bakteriziden Wirkungstyp auf und sind nur gegen extrazellulär liegende Bakterien effektiv. Durch die irreversible Bindung dieser Wirkstoffe an zwei im 16S-rRNA-Baustein der ribosomalen 30S-Einheit lokalisierte Adeninbasen in der Bakterienzelle verursachen sie eine Störung der Proteinbiosynthese, indem falsche Aminosäuren eingebaut werden. Auf diese Weise entstehen defekte Enzyme und Strukturproteine, die irreversible Membranschäden auslösen. Darüber hinaus verhindern Aminoglykoside die Bindung von N-Formylmethionyl-tRNA an die 30S-Untereinheit und damit den Anfang der Proteinsynthese. Da auch keine andere Aminoacyl-tRNA angelagert wird, bewirken sie zudem die Unterdrückung der Verlängerung der begonnenen Peptidkette (MUTSCHLER et al., 2008).

2.6.2 β -Lactam-Antibiotika

Zur Gruppe der β -Lactam-Antibiotika gehören die **Penicilline**, die **Cephalosporine**, die **Carbapeneme** und die **Monobactame**; charakteristisch für diese Substanzen ist der viergliedrige β -Laktam-Ring. Die Molekulargewichte der β -Lactam-Antibiotika betragen zwischen 300 und 500 Dalton. Die Präparate erweisen sich als gut wasserlöslich, insbesondere in sauren pH-Bereichen, und sind sehr empfindlich gegenüber Licht und Temperatur (FREY und LÖSCHER, 2002). Das Wirkungsspektrum umfasst grampositive und gramnegative Keime, stellt sich jedoch je nach Verbindung unterschiedlich dar. Diese Pharmaka zeichnen sich durch einen zeitabhängigen bakteriziden Wirkungstyp aus, zerstören jedoch nur proliferierende Keime, da es während der Zellteilung zur Öffnung der Peptidoglykanstränge kommt und nur hier die Mureinsynthese stattfindet. Murein macht bei grampositiven Keimen etwa 50 % und bei gramnegativen Bakterien 5-10 % der Zellwand aus (MUTSCHLER et al., 2008) und sorgt für die Stabilität der Erregerzelle (FREY und LÖSCHER, 2002). Zur Mureinsynthese werden die einzelnen intrazellulär gebildeten Anteile, nachdem sie über die Zytoplasmamembran transportiert wurden, zu einem Makromolekül zusammengesetzt (MUTSCHLER et al., 2008). Die genannten Pharmaka blockieren die Transpeptidasen durch kovalente Bindung des geöffneten β -Lactam-Rings an das aktive Zentrum dieser Enzyme irreversibel und inhibieren damit das Endstadium der Peptidoglykan-Synthese (Quervernetzung des Mureins), was in der Bakteriolyse resultiert (HEESEMANN, 1993; FREY und LÖSCHER, 2002; MUTSCHLER et al., 2008). Die Enzyme, welche bedeutsam für die Peptidoglykan-Synthese sind und durch die Bindung an β -Lactam-Antibiotika inaktiviert werden, tragen die Bezeichnung **Penicillin-bindende Proteine (PBP)**. Diese PBP's unterscheiden sich in den Bakterienarten ebenso wie der Aufbau der Zellwand variiert. Gleichmaßen differieren auch die verschiedenen β -Lactam-Antibiotika in ihrer Penetrationsfähigkeit durch die Zellwand und in ihrer Bindungsfähigkeit zu den Enzymen. Letztendlich stellen sich Präparate, welche an viele PBP's binden, als sehr breit wirksam dar, und bei der Kombination zweier β -Lactam-Antibiotika unterschiedlicher Bindungsaktivität besteht die Möglichkeit einer synergistischen Wirkung (MUTSCHLER et al., 2008).

Das Grundgerüst der **Penicilline** bildet die 6-Aminopenicillansäure. Innerhalb der Penicilline unterscheidet man Benzylpenicillin und dessen Salze, Oralpenicilline mit fehlender oder geringer Penicillinase-Festigkeit, Penicillinase-stabile Penicilline sowie Penicilline mit erweitertem Wirkungsspektrum (Aminopenicilline [Ampicillin, Amoxicillin] und

Acylaminopenicilline). Die Kombination von Penicillinen mit Substanzen, welche die bakterielle β -Lactamase inhibieren (sog. β -Lactamase-Inhibitoren), wird bei nicht β -Lactamase-stabilen β -Lactam-Antibiotika genutzt. Zu erwähnen ist hier die Kombination von Amoxicillin mit Clavulansäure (MUTSCHLER et al., 2008).

Bei den **Cephalosporinen** erfolgt eine Einteilung in fünf Gruppen. Zur Gruppe I werden Substanzen mit guter Wirkung gegen grampositive Kokken inklusive β -Lactamase-bildender Stämme gezählt. Der Gruppe II (Cefuroxim) sind Cephalosporine mit zusätzlicher Wirkung auf gramnegative Keime durch eine erhöhte β -Lactamase-Stabilität aufgrund einer sterischen Abschirmung des β -Lactam-Rings zugehörig. Wirkstoffe mit einem besonderen Effekt im gramnegativen Bereich sind der Gruppe III (Cefotaxim) zugeteilt, und Substanzen, die zusätzlich gegen *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt werden können, der Gruppe IIIb. Die Gruppe IV weist eine zusätzliche Wirksamkeit gegenüber Staphylokokken auf, und Cephalosporine mit besonderer Stabilität gegenüber von Anaerobiern gebildeten β -Lactamasen gehören der Gruppe V an. Cephalosporine stellen Abkömmlinge der 6-Aminopenicillansäure und Derivate der 7-Aminocephalosporansäure dar (MUTSCHLER et al., 2008).

Carbapeneme (Meropenem) zeichnen sich durch ein sehr breites Wirkungsspektrum aus, das gegen die meisten grampositiven, gramnegativen und anaeroben Keime gerichtet ist. Zusätzlich zeigen sie eine hohe Affinität zu weitgehend allen PBP's und weisen eine geringe Empfindlichkeit gegen bakterielle β -Lactamasen auf. Carbapeneme kommen bei schweren bakteriellen Infektionen und Mischinfektionen zum Einsatz (MUTSCHLER et al., 2008).

2.6.3 Chinolone/Fluorchinolone

Unter den Chinolonen werden die Substanzen der 1. Generation und die fluorierten Wirkstoffe der 2. Generation unterschieden. Die älteren, nicht-fluorierten Substanzen (**Nalidixinsäure**) haben überwiegend ihren Stellenwert verloren und zeichnen sich durch ein schmales Wirkungsspektrum, eine geringe Wirkstärke und erhebliche Resistenzentwicklung aus. Die fluorierten Mittel der 2. Generation tragen die Bezeichnung **Fluorchinolone**. Die Fluorsubstitution an C-6 sorgt für eine erhöhte Penetration in die Bakterienzelle und damit für eine bessere Wirkstärke. Die Wirkstoffe der 2. Generation sind in vier Gruppen unterteilt, die sich in Resistenzentwicklung, Wirkungsspektrum, Wirkstärke und Gewebepenetration

unterscheiden. Der Gruppe I sind orale Harnwegstherapeutika zugehörig, wohingegen in Gruppe II systemisch anwendbare Standardchinolone (Ciprofloxacin) vertreten sind. Diese besitzen gegenüber der Gruppe I eine stärkere Wirkung und ein breiteres Wirkungsspektrum. Fluorchinolone der Gruppe III (Levofloxacin) wirken stärker gegen grampositive sowie intrazelluläre Bakterien. Pharmaka der Gruppe IV sind darüber hinaus wirkungsvoller gegenüber grampositiven und intrazellulären Keimen und zudem gegen Anaerobier einsetzbar. Die Chinolone werden als Gyrasehemmer bezeichnet, da sie die Untereinheit A der bakteriellen DNA-Gyrase (Topoisomerase II) hemmen. Zusätzlich blockieren sie überwiegend bei grampositiven Erregern die Topoisomerase IV. Die Topoisomerasen vom Typ II sind für den Ablauf der DNA-Replikation bzw. Transkription von Bedeutung. Somit bewirken diese Präparate eine Unterdrückung der Nukleinsäuresynthese; der Wirkungstyp ist bakterizid (FREY und LÖSCHER, 2002; MUTSCHLER et al., 2008).

2.6.4 Sulfonamid-Diaminobenzylpyrimidin-Kombination

Sulfonamide werden aufgrund der bereits vorliegenden Resistenzen und der beträchtlichen unerwünschten Wirkungen nur noch in Kombination mit Diaminobenzylpyrimidinen genutzt. Die Kombination des Sulfonamids Sulfamethoxazol mit dem Diaminobenzylpyrimidin Trimethoprim (**Cotrimoxazol**) verursacht eine Wirkungssteigerung. Beide Präparate sind den Folsäureantagonisten zugehörig und lösen durch die Blockade des Folsäurestoffwechsels an zwei unterschiedlichen Stellen (Hemmung der Dihydrofolsäure: Sulfonamid; Hemmung der Dihydrofolsäurereduktase: Trimethoprim) einen synergistischen Effekt aus. Zu erwähnen ist hier neben der gesteigerten Wirksamkeit ein breiteres Wirkungsspektrum und eine Verlangsamung der Resistenzentstehung. Aufgrund der breiten Anwendung dieses Präparates bestehen allerdings auch hier bereits erhebliche Resistenzen. Für eine optimale Wirkung wird die Konzentration von Sulfamethoxazol und Trimethoprim in einem Verhältnis von 20:1 empfohlen (MUTSCHLER et al., 2008). In diesem Konzentrationsverhältnis wirkt das Präparat bakterizid, wohingegen beide Substanzen für sich einen bakteriostatischen Wirkungstyp aufweisen (FREY und LÖSCHER, 2002).

2.6.5 Tetrazykline

Tetrazykline sind durch das aus vier annelierten Sechseringen bestehende Grundgerüst charakterisiert und unterscheiden sich durch die Ringsubstituenten in ihrer Struktur. Das Wirkungsspektrum erfasst grampositive und gramnegative, aerobe und anaerobe Keime; weiterhin zeichnen sie sich durch einen bakteriostatischen Wirkungstyp aus. Diese Pharmaka hemmen die Proteinbiosynthese durch Anheftung an die ribosomale 30S-Untereinheit und verhindern dadurch die Bindung von Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorstellen der Ribosomen und damit die Verlängerung der Peptidkette. Durch Porine in der äußeren Membran und aktive Transportsysteme in der inneren Membran gelangen die Wirkstoffe in gramnegative Keime. Die erforderlichen MHK-Werte unterscheiden sich speziesabhängig sehr stark und variieren zudem regional (FREY und LÖSCHER, 2002; MUTSCHLER et al., 2008).

2.7 Resistenz gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika

2.7.1 Definitionen

Definitionsgemäß handelt es sich um einen resistenten Keim, wenn die minimale Hemmkonzentration (MHK) höher liegt als die höchste *in vivo* erreichbare Serum- bzw. Gewebekonzentration, die nicht toxisch ist (MUTSCHLER et al., 2008). Klinisch gesehen wird ein Bakterium als resistent eingestuft, wenn die erreichbare MHK mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem therapeutischen Misserfolg führt (EFSA, 2008). Zu unterscheiden ist **die primäre (natürliche) von der sekundären (erworbenen) Resistenz**. Bei der erstgenannten Form erweisen sich bestimmte Bakterien gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum bereits vor Therapiebeginn als resistent. Ursachen für diese Unempfindlichkeit bestehen im Fehlen entsprechender Zielstrukturen in der Bakterienzelle, in einer geringen Permeabilität der Zellwand sowie dem Vorkommen von Wirkstoff zerstörenden Enzymen (EFSA, 2008). Bei der Behandlung kann eine Selektion dieser unempfindlichen Stämme erfolgen. Ereignet sich dagegen während des Einsatzes einer antimikrobiellen Substanz eine spontane Mutation, liegt eine sekundäre Resistenz vor. Auch in diesem Fall kann eine Selektion dieser resistenten Mutanten die Konsequenz sein. Zusätzlich wird zwischen der **Einschritt- (One-step-) und Vielschritt- (Multi-step-) Resistenz** differenziert. Relativ rasch nach Beginn der antibiotischen Behandlung kann eine Einschritt-Resistenz auftreten, während

sich die Vielschritt-Resistenz erst mit der Zeit und stufenweise durch mehrere Mutationsschritte entwickelt. Eine **Parallel-** oder auch **Kreuzresistenz** liegt dagegen vor, wenn eine Resistenz gegenüber zwei oder mehr Antibiotika auffällt, die chemisch verwandt sind oder sich durch den gleichen Wirkmechanismus bzw. den gleichen Angriffspunkt auszeichnen (MUTSCHLER et al., 2008).

2.7.2 Grundlagen der Entwicklung und Mechanismen von Resistenzen

Zu unterscheiden sind die **chromosomale Resistenz**, in deren Fall die Resistenz gegenüber einem Antibiotikum im bakteriellen Chromosom verankert ist, und die **extrachromosomale Resistenz**. Bei der zuletzt genannten Form liegt das genetische Material extrachromosomal in **Plasmiden** vor. Diese besitzen das Vermögen, sich unabhängig von der Teilung des Bakteriums zu vermehren und sind zwischen Bakterien übertragbar. Bei Resistenzplasmiden handelt es sich um ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe (<2 kbp bis >100 kbp), welche Resistenzgene gegen ein oder mehrere Antibiotika tragen. Zudem beherbergen sie einen Faktor, der die Übertragung zwischen den Bakterien durch **Konjugation** (Transfer über Zell-zu-Zell-Kontakt durch Ausbildung von Fertilitätspili) oder **Transduktion** (Übertragung durch Bakteriophagen) ermöglichen. Die Weitergabe von Plasmiden mittels Konjugation ist nicht speziesspezifisch, so dass Resistenzen auch auf andere Bakterienspezies übertragbar sind. Demgegenüber sind Phagen keimspezifisch, weshalb die Transduktion an die Bakterienart gebunden ist. Die Aufnahme reiner, von anderen Bakterien abgegebener DNA aus der nahen Umgebung wird als **Transformation** bezeichnet (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA, 2001; FREY und LÖSCHER, 2002; MUTSCHLER et al., 2008). Bei **Transposons** handelt es sich um bewegliche DNA-Segmente unterschiedlicher Größe (<1 kbp bis 60 kbp), die sich auf Plasmiden befinden, jedoch ebenso in Chromosomen lokalisiert sein können. Sie vermögen sich selbst von einer Donorzelle zu einer Empfängerzelle zu übertragen, sind jedoch nicht zur eigenständigen Vermehrung befähigt. Nach dem Erreichen von Rezipientenzellen werden sie entweder in Plasmide oder in Chromosomen eingesetzt (SCHWARZ und KEHRENBURG, 2000; SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA, 2001; FREY und LÖSCHER, 2002). **Genkassetten** besitzen weder ein Replikations- noch ein Transfersystem und liegen häufig an einer bestimmten Stelle in einer Integronstruktur, welche in Plasmiden oder Chromosomen lokalisiert sind (SCHWARZ und KEHRENBURG, 2000). Mithilfe der genannten beweglichen DNA-Segmente besteht die

Möglichkeit der Resistenzverbreitung (MUTSCHLER et al., 2008). Aufgrund der Tatsache, dass Transposons und Plasmide mehrere Resistenzgene gleichzeitig tragen können, ist darüber hinaus gewährleistet, dass bei Anwendung eines Wirkstoffs Resistenzen gegenüber anderen Substanzen mit übertragen werden können (SCHWARZ und KEHRENBURG, 2000).

Zu den **Resistenzmechanismen** zählen die Produktion von Enzymen, welche antimikrobielle Chemotherapeutika durch hydrolytische Spaltung oder chemische Veränderungen inaktivieren (β -Lactame und Aminoglykoside), die Veränderung der Zellpermeabilität und damit eine eingeschränkte Aufnahme der Antibiotika (β -Lactam-Antibiotika, Aminoglykoside, Fluorchinolone, Sulfonamide und Trimethoprim), die Bildung von substratspezifischen oder -unspezifischen Effluxsystemen, welche zum Auswärtstransport von Wirkstoffen führen (Tetrazykline) und zudem die durch Mutation bedingte Verminderung der Bindungsfähigkeit an die Zielstruktur der Pharmaka (β -Lactame) (SCHWARZ und KEHRENBURG, 2000; MUTSCHLER et al., 2008). Die für inaktivierende Enzyme codierenden Sequenzen sind größtenteils auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert. Die Gene für spezifische Effluxsysteme liegen ebenfalls auf beweglichen DNA-Segmenten, wohingegen die codierenden Sequenzen der substratspezifischen „Multidrug-Transporter“ auf Chromosomen nachgewiesen wurden. Gene für die Veränderung der Angriffsstelle der Wirkstoffe sind auf Plasmiden und Transposons lokalisiert (SCHWARZ und KEHRENBURG, 2000). Die Informationen bezüglich der Resistenzmechanismen von VTEC-Stämmen sind sehr gering, so dass in dieser Hinsicht weiterer Forschungsbedarf besteht (MORA et al., 2005).

2.7.2.1 Aminoglykoside

Eine Resistenzentstehung gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika kann sehr rasch in der Therapie auftreten (MUTSCHLER et al., 2008), wobei die Geschwindigkeit variiert. Ältere Aminoglykoside weisen Resistenzentwicklungen nach dem One-step-Typ auf und Aminoglykoside der Gentamicin-Gruppe nach dem Multi-step-Typ (FREY und LÖSCHER, 2002). Das Aufkommen von Resistenzen ist meist durch die Bildung von Enzymen (Acetyltransferasen, Adenyltransferasen und Phosphotransferasen) begründet, welche diese Pharmaka modifizieren und damit inaktivieren. Die für diese Enzyme codierenden Gene sind auf Plasmiden lokalisiert. Zusätzlich können chromosomale Mutationen eine verminderte

Affinität der am Ribosom gelegenen Bindungsstellen bzw. eine Änderung der Membranpermeabilität auslösen (SCHWARZ und KEHRENBURG, 2000; MUTSCHLER et al., 2008).

2.7.2.2 **β -Lactam-Antibiotika**

Für die sich langsam entwickelnde Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika kommen unterschiedliche Ursachen in Frage. Zum Einen ist es möglich, dass die Keime unempfindliche PBP's aufweisen, was mit der Mutation der für diese Zielstrukturen codierenden Gene zu erklären ist. Zum Anderen kann es zur Bildung von **β -Lactamasen** kommen, die in der Lage sind, β -Lactam-Antibiotika durch Öffnung des β -Lactam-Rings zu inaktivieren und so deren antibakterielle Wirkung zu unterbinden. Die für diese Enzyme codierenden Gene sind auf Chromosomen oder Plasmiden lokalisiert. Die β -Lactamasen werden je nach Substratspezifität in Penicillinasen und Cephalosporinasen unterteilt; es kommen jedoch auch Breitspektrum- β -Lactamasen (ESBL: expanded-spectrum β -lactamases) vor, die alle Gruppen der β -Lactam-Antibiotika zu inaktivieren vermögen. Grampositive Keime, welche β -Lactamasen produzieren, geben die Enzyme nach außen ab, und gramnegative β -Lactamase-bildende Bakterien behalten diese im periplasmatischen Raum. Die dritte Form der Resistenzentwicklung ist in Membranveränderungen (Modifikation von Porinen) begründet (MUTSCHLER et al., 2008), und zusätzlich können diese Pharmaka durch Effluxsysteme aktiv aus der Bakterienzelle transportiert werden (SCHWARZ und KEHRENBURG, 2000). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, dass bei den Substanzen der Penicillingruppe häufig Kreuzresistenzen zu verzeichnen sind (FREY und LÖSCHER, 2002).

2.7.2.3 **Chinolone/Fluorchinolone**

Die Resistenzentstehung gegen Fluorchinolone wird durch chromosomale Mutationen bewirkt. Resistenzen können einerseits in der Mutation der Gene, welche für die A-Untereinheiten der bakteriellen DNA-Gyrase und der Topoisomerase IV codieren, begründet sein, so dass die genannten Enzyme eine geringere Empfindlichkeit aufweisen oder aber in der gesteigerten Produktion von Effluxpumpen (SCHWARZ und KEHRENBURG, 2000; MUTSCHLER et al., 2008). Plasmid-vermittelte Resistenzen kommen aufgrund der Hemmwirkung dieser Pharmaka auf die Replikation der Plasmide und die bakterielle Konjugation

nicht vor. Bei der Nalidixinsäure als Vertreter der Chinolone ohne Fluorsubstitution entwickeln sich durch One-step-Mutationen schnell Resistenzen, wohingegen antibakterielle Unempfindlichkeiten bei Fluorchinolonen meist nach dem Multi-step-Muster mit geringer Mutationshäufigkeit entstehen. Als positiv zu verzeichnen ist der Umstand, dass die entstandenen Resistenzen nicht stabil und nach Absetzen der Pharmaka spontan reversibel sind (FREY und LÖSCHER, 2002). Es ist hervorzuheben, dass sich die neueren Gyrasehemmer teilweise durch eine Parallelresistenz auszeichnen (MUTSCHLER et al., 2008).

2.7.2.4 Sulfonamid-Diaminobenzylpyrimidin-Kombination

Aufgrund des häufigen Einsatzes des Sulfamethoxazol-Trimethoprim-Kombinationspräparates Cotrimoxazol sind heutzutage viele resistente Bakterien zu verzeichnen. Sowohl bei Sulfonamiden als auch bei Trimethoprim erfolgt die Resistenzentwicklung durch die Verringerung der Zellpermeabilität (MUTSCHLER et al., 2008); zudem können empfindliche Angriffsstellen durch unempfindliche ersetzt werden (SCHWARZ und KEHRENBURG, 2000). Die Resistenz gegenüber Sulfonamiden ist auf Integrons (*sulI*-Gen) und Plasmiden (*sulII*-Gen) lokalisiert (RÅDSTRÖM et al., 1991; ENNE et al., 2001).

2.7.2.5 Tetrazykline

Bei gegenüber Tetrazyklinen resistenten Keimen kann zum Einen der aktive Transport über die innere Membran verhindert sein und zum Anderen können Tetrazyklin-spezifische oder Multi-drug-Effluxpumpen für den aktiven Transport des Wirkstoffes aus der Bakterienzelle sorgen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer strukturellen Änderung der ribosomalen Bindungsstelle. Für diese Resistenzformen verantwortliche Gene sind auf Plasmiden verankert (MUTSCHLER et al., 2008).

2.7.3 **Ausbreitung von Resistenzgenen und resistenten Mikroorganismen**

Bewegliche, teilweise mehrere Resistenzgene tragende DNA-Segmente wie Plasmide und Transposons und üblicherweise ein Gen tragende Genkassetten erleichtern die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA, 2001; MUTSCHLER et al., 2008). Neben diesem **horizontalen Gentransfer** ist die **vertikale** Weitergabe von Resistenzgenen an Tochterzellen von Bedeutung. Mittels Resistenzgenen sind Resistenzen gegenüber einzelnen Pharmaka oder Substanzen der gleichen, aber auch gegen Vertreter unterschiedlicher Wirkstoffklassen, welche den identischen Wirkmechanismus nutzen, übertragbar. Zusätzlich ist die Weitergabe von Resistenzen gegenüber strukturell und funktionell unterschiedlichen antimikrobiellen Chemotherapeutika möglich, wenn es sich beispielsweise um unspezifische Effluxsysteme („Multidrug-Transporter“) handelt, die Antibiotika mittels aktiven Transports aus der Zelle bringen (SCHWARZ und KEHRENBURG, 2000).

Es existiert ein gewisses Repertoire an resistenten Keimen bzw. Resistenzgenen, welche direkt oder indirekt auf den Menschen oder auf humanpathogene Erreger transferierbar sind. Zur Weitergabe tragen der Kontakt zwischen Mensch und Tier bzw. deren Exkrete sowie tierische und pflanzliche kontaminierte Lebensmittel oder fäkal verunreinigte Abwässer und Badegewässer und das Ausbringen von Gülle bzw. Mist bei (FEUERPFIL et al., 1999; FREY und LÖSCHER, 2002; EFSA, 2008). Der Transfer resistenter Zoonoseerreger auf den Menschen ist in diesem Rahmen von zentraler Bedeutung (STROH, 2002; FLUGS, 2007). Als einer der wichtigsten Faktoren für die Verbreitung von resistenten Keimen und Resistenzgenen wird der durch übermäßige Antibiotikaaanwendung in der Humanmedizin, aber auch bei Tieren, in der Tierernährung und in der Landwirtschaft ausgeübte Selektionsdruck angesehen (VON BAUM und MARRE, 2005). Es liegen geteilte Ansichten vor, inwieweit sich die Verwendung von Antibiotika in der Tierhaltung auf das Resistenzgeschehen humanpathogener Keime auswirkt (FREY und LÖSCHER, 2002), denn ein gravierender Teil dieser Substanzen ist Antibiotikaklassen zugehörig, die auch bei humanen Infektionen Anwendung finden (EFSA, 2008). Vielfach geteilt wird allerdings die Ansicht, dass die **Resistenzprobleme in der Humanmedizin** vorwiegend auf den übermäßigen und oftmals auch unzulänglichen Einsatz (zu geringe Dosierung, zu kurze Anwendungsdauer) der antimikrobiellen Chemotherapeutika bei der Behandlung humaner Infektionen zurückzuführen sind. Die genannten Aspekte erhöhen den Selektionsdruck auf die Bakterien

und bewirken eine Resistenzselektion (WALLMANN, 1999; FREY und LÖSCHER, 2002; FLUGS, 2007).

2.8 Resistenzlage bei VTEC

Viele VTEC-Stämme sind gegenüber einigen antimikrobiellen Wirkstoffen, welche gewöhnlich in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden, resistent (KRISHNAN et al., 1987; FARINA et al., 1996). Die Angaben zur Resistenzhäufigkeit dieser pathogenen Keime differieren in der Literatur jedoch sehr stark. So ließen sich in Indien (KHAN et al., 2002) bei 49,2 % der untersuchten non-O157:H7-Stämme Resistenzen aufzeigen, wohingegen in Irland nur geringe Resistenzen von 13,2 % bei VTEC-Stämmen zu verzeichnen waren (WALSH et al., 2006). Ebenfalls zeigt ein Vergleich der Resistenzen von O157- und non-O157-VTEC unterschiedliche Ergebnisse auf. So fanden MORA et al. (2005) gleiche Resistenzhäufigkeiten bei O157:H7-Stämmen (41,1 %) und bei non-O157:H7-VTEC (41,3 %) aus Spanien. Im Gegensatz zu dieser Studie wurden in Deutschland bei humanen Stämmen häufiger resistente non-O157:H7-VTEC (20,5 %) als O157:H7-VTEC (1,3 %) dargestellt (SCHMIDT et al., 1998), ebenso wie in Italien (85,7 % bei non-O157-Stämmen und 20 % Resistenz bei O157-Stämmen; FARINA et al., 1996). Die Überprüfung der aus unterschiedlichen Ländern stammenden VTEC-Stämme verschiedenen Ursprungs ergab am häufigsten Resistenzen gegen Tetrazyklin, Streptomycin und Ampicillin sowie gegen Sulfonamide (FARINA et al., 1996; SCHMIDT et al., 1998; STEPHAN und SCHUMACHER, 2001; WILLSHAW et al., 2001; ZHAO et al., 2001; KHAN et al., 2002; SCHROEDER et al., 2002a+b; BETTELHEIM et al., 2003; MORA et al., 2005; SINGH et al., 2005), ferner gegen Trimethoprim (BETTELHEIM et al., 2003; MORA et al., 2005) und Nalidixinsäure (WALSH et al., 2006). Interessanterweise stellten VON MÜFFLING et al. (2007) darüber hinaus eine 100 %ige Resistenz der untersuchten VTEC-Stämme unterschiedlichen Ursprungs gegen alle getesteten Sulfonamide fest. Mehrfachresistenzen sind für die Kombination Tetrazyklin, Streptomycin und Sulfonamide beschrieben worden (FARINA et al., 1996; PEBODY et al., 1999; GIAMMANCO et al., 2002; PAYNE et al., 2003; MORA et al., 2005). Als Begründung für die häufige Resistenz gegen diese Antibiotika wird die verbreitete Nutzung bei Schweinen und Rindern angenommen (STEPHAN und SCHUMACHER, 2001). Viele Arbeitsgruppen wiesen VTEC nach, die gegen mindestens fünf Antibiotika resistent waren (SCHMIDT et al., 1998; STEPHAN und

SCHUMACHER, 2001; GIAMMANCO et al., 2002; MORA et al., 2005). WALSH et al. (2006) war es überdies möglich, einen Stamm aufzuzeigen, welcher gegen 10 antimikrobielle Chemotherapeutika (aus sieben unterschiedlichen Antibiotikaklassen) Resistenzen aufwies. Durch die offensichtliche Resistenzentwicklung dieser Erreger wird eine weitere Einschränkung der therapeutischen Möglichkeiten befürchtet (EFSA, 2008).

SINGH et al. (2005) stellten in ihrer Studie dar, dass 16 % der untersuchten VTEC-Stämme unterschiedlichen Ursprungs Resistenzgen-tragende Klasse 1-Integrone aufwiesen, welche sich mittels Konjugation zwischen *E. coli*-Stämmen transferieren ließen. Klasse 1-Integrone ermöglichen die Entstehung und Verbreitung von Einfach- und Mehrfachresistenzen zwischen den Stämmen, unabhängig von deren Ursprung (LEVERSTEIN-VAN HALL et al., 2002; EFSA, 2008). Bereits in früheren Jahren wurden Klasse 1-Integrone in Chromosomen und Plasmiden dargestellt, welche für die Sulfonamid-Resistenz verantwortliche *sulI*-Gene, die Trimethoprim-Unempfindlichkeit codierende *dfrXII*- bzw. *dfrA1*-Gene und die Streptomycin- und Spektinomycin-Resistenz-auslösende *aadA2*-Gene enthielten (ZHAO et al., 2001; MAIDHOF et al., 2002). Diese ließen sich mittels Konjugation auf einen anderen *E. coli* O157:H7-Stamm und verschiedene *Hafnia alvei*-Stämme übertragen (ZHAO et al., 2001). Ebenso waren bei VTEC Klasse 1-Integrone auffindbar, welche β -Lactamase codierende *temI*-Gene enthielten, und auch diese Resistenzen ließen sich auf einen Salmonellen-Stamm mittels Konjugation und Transformation übertragen (WALSH et al., 2006). Dessen ungeachtet ist das Vorkommen von Klasse 1-Integrone jedoch nicht zwingend mit dem Phänomen der Antibiotikaresistenz eines Stammes verbunden, da die Resistenzgene entweder nicht vorhanden oder nicht exprimiert sein können (SINGH et al., 2005).

Vergleiche von VTEC mit nicht VT-produzierenden Stämmen ergaben wiederholt, dass non-VTEC Stämme häufiger antimikrobielle Resistenzen aufweisen als VT-bildende Stämme. So zeigten BETTELHEIM et al. (2003), dass 15,5 % der isolierten VTEC-Stämme unterschiedlichen Ursprungs Resistenzen aufzeigten, wohingegen 32,9 % der untersuchten nicht VT-produzierenden Stämme ähnlich differierender Herkunft resistent waren. SCHROEDER et al. (2002a) wiesen für humane Stämme ähnliche Ergebnisse nach wie in der zuvor genannten Studie, wohingegen VTEC- und andere *E. coli*-Stämme bovinen Ursprungs Resistenzhäufigkeiten der gleichen Höhe aufwiesen.

Die teilweise hohen Resistenzprävalenzen von VTEC werden als Anlass zur Besorgnis gesehen (MORA et al., 2005). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Überwachung und Charakterisierung resistenter Stammformen dieser Pathogruppe von erheblicher Relevanz sind (WHITE et al., 2002).

2.8.1 Resistenzsituation bei von Menschen isolierten VTEC-Stämmen

In verschiedenen Ländern wurden bereits Resistenzen bei von gesunden und kranken Erwachsenen und Kindern isolierten VTEC-Stämmen nachgewiesen. Auch bei den Stämmen humanen Ursprungs sind Resistenzen gegen einige bestimmte Antibiotika wie Tetrazyklin, Streptomycin, Ampicillin und Sulfonamide auffällig (FARINA et al., 1996).

Durch die Entstehung und Verbreitung antimikrobieller Resistenzen innerhalb dieser Pathogruppe werden negative klinische und epidemiologische Auswirkungen befürchtet (SCHMIDT et al., 1998; WHITE et al., 2002). So scheinen, obwohl in der Mehrzahl der Fälle keine antimikrobiellen Substanzen zur Therapie von EHEC-Infektionen eingesetzt werden, die Resistenzen dieser Erreger anzusteigen (ref. in MORA et al., 2005). Einen Eindruck beispielhafter antimikrobieller Resistenzen von humanen VTEC-Stämmen liefert Tabelle 19.

Tabelle 19: Antimikrobielle Resistenzen bei humanen VTEC-Stämmen

Land	Zeit- raum	Methode	Anzahl get. ¹⁾ Anti- biotika	Ursprung der Stämme	Anzahl get. ¹⁾ Stämme	Anzahl res. ²⁾ Stämme (%)	Quelle
AUS ³⁾	1987- 1992	Platten- Replikator	11	Kranke/ gesunde Kinder/Er- wachsene	59	3 (5,1)	BETTELHEIM et al., 2003
CH ⁴⁾	1997- 1999	Agar- diffusion	13	Arbeiter der Fleisch- waren- industrie	47	13 (27,7)	STEPHAN und SCHUMACHER, 2001
D ⁵⁾	1996	1) Agar- diffusion	12	HC-Kranke	64	11 (17,2)	SCHMIDT et al., 1998
		2) res. Stämme: MHK mittels E-Test		HUS- Kranke	61	5 (8,2)	
				Gesunde	41	3 (7,3)	
E ⁶⁾	1992- 1999	Agar- diffusion	26	v.a. DF- Kranke	138	54 (39,1)	MORA et al., 2005
F ⁷⁾	k.A. ⁸⁾	Agar- diffusion	13	DF-Kranke	9	1 (11,1)	GIAMMANCO et al., 2002
I ⁹⁾	k.A.	Agar- diffusion	13	HUS- Kranke	4	2 (50,0)	GIAMMANCO et al., 2002
	1988- 1994	Agar- diffusion	11	blutige Diarrhö-/ HUS- Kranke	22	11 (50,0)	FARINA et al., 1996
IRL ¹⁰⁾	k.A.	Agar- diffusion	15	k.A.	21	2 (9,5)	WALSH et al., 2006
¹⁾ getestet			²⁾ resistent		³⁾ Australien		⁴⁾ Schweiz
⁵⁾ Deutschland			⁶⁾ Spanien		⁷⁾ Frankreich		⁸⁾ keine Angabe
⁹⁾ Italien			¹⁰⁾ Irland				

Diese Tabelle zeigt die unterschiedlichen Resistenzprävalenzen in verschiedenen Ländern, wobei auch häufig mehrfach resistente Keime zu verzeichnen waren. Beispielhaft zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang die Untersuchungen von FARINA et al. (1996) über 22 EHEC-Stämme, welche von an blutiger Diarrhö oder HUS erkrankten Menschen in Italien kultiviert worden waren. Diese erwiesen sich zu 50 % als resistent, wobei 10 der 11 unempfindlichen Stämme eine Resistenz gegen mindestens zwei der getesteten Antibiotika aufwiesen. Die Empfindlichkeitsbestimmung von 59 humanen EHEC-Stämmen aus Australien (BETTELHEIM et al., 2003) ergab im Einklang mit der zuletzt genannten Studie, dass drei der vier resistenten Stämme Mehrfachresistenzen aufzeigten. So erwies sich ein von

einem HC-Patienten isolierter Stamm als resistent gegen sechs Antibiotika, und bei zwei Stämmen von humanen HUS-Fällen wurden Drei- bzw. Vierfach-Resistenzen nachgewiesen. Die Empfindlichkeitstestung von 166 von gesunden, Durchfall- und HUS-kranken Menschen isolierten Stämmen aus Deutschland ergab sechs einfach resistente EHEC, weitere sechs Stämme mit Resistenzen gegen zwei Antibiotika und sieben Stämme, welche gegen vier und mehr dieser Pharmaka keine Empfindlichkeit zeigten, wobei die Durchfall-assoziierten EHEC am häufigsten Resistenzen aufwiesen (17,2 %) (SCHMIDT et al., 1998). Die Resistenztestung von 18 während eines Ausbruchs in Kanada isolierten VTEC O157:H7-Stämmen ergab dagegen eine Sensibilität der Stämme gegen alle getesteten, zur Behandlung von *E. coli*-Infektionen eingesetzten Antibiotika (u.a. Ampicillin, Tetrazyklin, Gentamicin, Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Nalidixinsäure) (KRISHNAN et al., 1987). Jedoch zeigten auch während weiterer Ausbruchsgeschehen durchgeführte Untersuchungen von EHEC-Stämmen multiresistente Stämme auf (PEBODY et al., 1999; PAYNE et al., 2003).

Da die Ausbreitung resistenter EHEC zukünftige Behandlungsstrategien für Infektionen mit diesen Erregern gefährden, ist eine Überwachung der Empfindlichkeiten zur Sicherung der öffentlichen Gesundheit erforderlich (SCHROEDER et al., 2002b).

2.8.2 Resistenzsituation bei von Rindern isolierten VTEC-Stämmen

Rinder gelten als Reservoir für VTEC und sind daher von besonderer Bedeutung für die Übertragung unempfindlicher Stämme auf den Menschen (EFSA, 2008). Resistente VTEC verfügen im Darm von Rindern beim Einsatz von antimikrobiellen Chemotherapeutika möglicherweise über einen Selektionsvorteil gegenüber der fäkalen Flora, was eine kumulative Ausscheidung dieses pathogenen Erregers auslösen und die Häufigkeit des Auffindens von VTEC in Lebensmitteln bovinen Ursprungs erhöhen kann (FARINA et al., 1996; ZHAO et al., 2001). Von den Lebensmitteln tierischen Ursprungs ist kontaminiertes Fleisch boviner Herkunft als Überträger resistenter Stämme auf den Menschen aufgrund des Reservoirstatus dieser Tiere von entscheidender Relevanz (EFSA, 2008). Ein Großteil der alimentär bedingten Erkrankungen resultiert aus der fäkalen Kontamination während des Schlachtprozesses oder durch Kreuzkontaminationen im Laufe der anschließenden Verarbeitung (AARESTRUP und WEGENER, 1999). Antimikrobielle Resistenzen von VTEC-Stämmen bovinen Ursprungs sind exemplarisch in Tabelle 20 wiedergegeben.

Tabelle 20: Antimikrobielle Resistenzen von VTEC-Stämmen bovinen Ursprungs

Land	Zeit- raum	Methode	Anzahl get. ¹⁾ Anti- biotika	Ursprung der Stämme	Anzahl get. ¹⁾ Stämme	Anzahl res. ²⁾ Stämme (%)	Quelle
AUS ³⁾	1996- 2001	Platten- Replikator	11	Kot und LM ⁴⁾	83	5 (6,0)	BETTELHEIM et al., 2003
CH ⁵⁾	1996- 1997	Agar- diffusion	10	Coli-Mastitis	4	1 (25,0)	STEPHAN und KÜHN, 1999
	1997- 1999	Agar- diffusion	13	R.H.fl. ⁶⁾ (9) Schl.t.k. ⁷⁾ (6) Kälber (4) Mastitis (4)	23	8 (34,8)	STEPHAN und SCHUMACHER 2001
D ⁸⁾	k.A. ⁹⁾	Agar- diffusion	6	Mastbullen (20)	36	0	BÜLTE et al., 1990
				Milchrinder (10)	28	0	
E ¹⁰⁾	1992- 1999	Agar- diffusion	26	Rinder, gesund	514	207 (40,3)	MORA et al., 2005
				R.H.fl. ⁶⁾	65	36 (55,4)	
F ¹¹⁾	k.A.	Agar- diffusion	13	Kälber	5	0	GIAMMANCO et al., 2002
I ¹²⁾	k.A.	Agar- diffusion	13	Kälber	15	9 (60,0)	GIAMMANCO et al., 2002
				spanische ¹³⁾ Kälber	6	1 (16,7)	
	k.A.	Agar- diffusion	11	französische ¹³⁾ Kälber	11	3 (27,3)	FARINA et al., 1996
IRL ¹⁴⁾	k.A.	Agar- diffusion	11	Rinder	7	4 (57,1)	
	2001- 2003	Agar- diffusion	12	Milchfilter	16	1 (6,3)	MURPHY et al., 2005
	2004- 2005	Agar- diffusion	15	Milchfilter	5	2 (40,0)	MURPHY et al., 2007
	k.A.	Agar- diffusion	15	Rinder, klinische Proben	18	6 (33,3)	WALSH et al., 2006
				Rinderfell	204	13 (6,4)	
k.A.	1987- 1998	Mikro- dilution	13	R.H.fl.	30	28 (93,3)	KLEIN und BÜLTE, 2003
				Kot	5	3 (60,0)	

¹⁾ getestet⁵⁾ Schweiz⁹⁾ keine Angabe¹³⁾ importiert²⁾ resistent⁶⁾ Rinderhackfleisch¹⁰⁾ Spanien¹⁴⁾ Irland³⁾ Australien⁷⁾ Schlachttierkörper¹¹⁾ Frankreich⁴⁾ Lebensmittel⁸⁾ Deutschland¹²⁾ Italien

Aus dieser Tabelle ist die in vielen Ländern verbreitete Resistenz von VTEC-Stämmen unterschiedlichen bovinen Ursprungs ersichtlich (Lebensmittel, Kot, Schlachttierkörper, Milchfilter). Ungeachtet dessen wird in Australien aufgrund der Tatsache, dass alle taxierten resistenten Stämme von gastrointestinal kranken Tieren stammten, Lebensmittel und gesunde Tiere jedoch keine unempfindlichen VTEC aufwiesen, davon ausgegangen, dass VTEC-Stämme gesunder Rinder in Australien keine gravierende Gefahr in Bezug auf die Resistenzübertragung auf den Menschen darstellen (BETTELHEIM et al., 2003). Untersuchungen von 64 Stämmen (von 30 Rindern) in Deutschland ergaben keine Resistenzen (BÜLTE et al., 1990). Im Gegensatz zu diesen geringen bzw. nicht auffindbaren Prävalenzen stellten KLEIN und BÜLTE (2003) höhere Resistenzhäufigkeiten fest, wobei 22 der 28 resistenten bzw. intermediär-empfindlichen Stämme aus Hackfleisch und alle auffälligen Stämme aus Rinderkot Unempfindlichkeiten gegen Cefalotin aufzeigten. Ebenfalls erwiesen sich in Italien vier von sieben untersuchten bovinen VTEC-Stämmen als resistent bzw. multiresistent, wobei immer die gleichfalls bei Menschen häufig auftretende Kombination von Tetracyclin, Streptomycin und einem Sulfonamid festzustellen war (FARINA et al., 1996). Analog zeigten bei den von GIAMMANCO et al. (2002) untersuchten neun resistenten Kälber-Stämmen aus Italien sieben Stämme Resistenzen gegen mindestens zwei antimikrobielle Substanzen, ebenso wie die resistenten Stämme von den aus Spanien und Frankreich nach Italien importierten Kälbern, und auch hier war die von FARINA et al. (1996) festgestellte Kombination am häufigsten vertreten. Zusätzlich gelang es in Indien mittels PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) und RAPD (random amplification of polymorphic DNA) nicht übereinstimmende Stämme humanen und bovinen Ursprungs aufzufinden, wobei phylogenetische Analysen auf einen evolutionären Zusammenhang hinwiesen. Diese Ergebnisse veranlassten die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass in diesem Land Stämme von Rindern bis dahin nicht auf Menschen übertragen wurden, was mit dem religionsbedingt relativ geringen Rindfleischkonsum in Indien zusammenhängen könnte (KHAN et al., 2002). Fäkal kontaminierte Rohmilch und Rohmilchprodukte gelten ebenfalls als Ursprung für VTEC und bedeuten eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit (STEPHAN und KÜHN, 1999; MURPHY et al., 2007). Mit der Untersuchung von Milchfiltern ist es möglich, ganze Milchrindherden auf den pathogenen Erreger zu überprüfen (MURPHY et al., 2005). Analog zu anderen bovinen VTEC sind auch in solchen Stämmen antimikrobielle Resistenzen nachweisbar (MURPHY et al., 2005; MURPHY et al., 2007).

Das Vorkommen resistenter boviner VTEC-Stämme beweist die Bedeutsamkeit der Resistenz-Surveillance bei diesem pathogenen Erreger (FARINA et al., 1996). Gleichfalls wird die Überwachung einer Antibiotikaresistenz-Entwicklung während der Produktion tierischer Lebensmittel als notwendig angesehen, da viele humane EHEC-Infektionen durch ungenügend erhitztes Rindfleisch ausgelöst werden (GALLAND et al., 2001).

2.8.3 Resistenzsituation bei von anderen Hauswiederkäuern und Schweinen isolierten VTEC-Stämmen

Es ist anzuraten, besonders die Selektion neuer Unempfindlichkeiten bei Tieren zu überwachen, da resistente und auch multiresistente Keime, welche in Tieren selektiert werden, auf den Menschen übertragbar sind (MAIDHOF et al., 2002). Bei anderen Hauswiederkäuern und Schweinen taxierte Resistenzen sind in Tabelle 21 aufgezeigt.

Tabelle 21: Antimikrobielle Resistenzen von VTEC-Stämmen (ovin, caprin, porcin)

Land	Zeit- raum	Methode	Anzahl get. ¹⁾ Anti- biotika	Ursprung der Stämme	Anzahl get. ¹⁾ Stämme	Anzahl res. ²⁾ Stämme	Quelle
AUS ³⁾	1970- 2001	Platten- Replikator-	11	Schafe	27	0	BETTELHEIM et al., 2003
	1996- 2001			Schweine	31	22 (71,0)	
CH ⁴⁾	1997- 1999	Agar- diffusion	13	Schweine	12	9 (75,0)	STEPHAN und SCHUMACHER 2001
E ⁵⁾	1992- 1999	Agar- diffusion	26	Schafe, gesund	5	1 (20,0)	MORA et al., 2005
IRL ⁶⁾	2004- 2005	Agar- diffusion	15	Milchfilter, caprin	4	0	MURPHY et al., 2007
k.A. ⁷⁾	1987- 1998	Mikro- dilution	13	Schafkot	10	9 ⁸⁾ (90,0)	KLEIN und BÜLTE, 2003
				Lamm- fleisch	5	5 ⁸⁾ (100)	

¹⁾ getestet

²⁾ resistent

³⁾ Australien

⁴⁾ Schweiz

⁵⁾ Spanien

⁶⁾ Irland

⁷⁾ keine Angabe

⁸⁾ intermediär-empfindliche und resistente Stämme

Die Überprüfung von VTEC-Stämmen oviner, capriner und porciner Herkunft weisen sich durch relativ niedrige Untersuchungszahlen aus. Die Testung von aus Irland stammenden Milchfiltern capriner Herden (MURPHY et al., 2007) ebenso wie die Prüfung von VTEC-Stämmen oviner Herkunft in Australien ergaben keine Resistenzen (BETTELHEIM et al., 2003). Im Gegensatz zu diesen Daten stehen die Ergebnisse von KLEIN und BÜLTE (2003), welche bei neun von 10 VTEC aus Schafkot und bei allen fünf Stämmen aus Lammfleisch Resistenzen ermittelten, wobei allen resistenten bzw. intermediär-empfindlichen VTEC Unempfindlichkeiten gegen Cefalotin gemein waren.

Von den in Australien untersuchten Schweine-Stämmen erwiesen sich 71 % (22/31) als unempfindlich. Vierzehn dieser Stämme waren gegen mindestens zwei Antibiotika resistent, und am häufigsten ließen sich Unempfindlichkeiten gegen Tetrazyklin, Streptomycin und Sulfathiazol aufzeigen; eine Situation, die auch schon bei humanen und bovinen VTEC-Stämmen auffällig war. Analog hierzu war es auch in Deutschland möglich, bei allen 16 von fünf Schweinen stammenden VTEC-Stämmen Resistenzen nachzuweisen (BÜLTE et al., 1990). Die von VON MÜFFLING et al. (2007) untersuchten VTEC-Stämme porcinen Ursprungs erwiesen sich, abgesehen von der Sulfonamid-Resistenz (100 %), zu 56 % als resistent, wobei am häufigsten Resistenzen gegen Tetrazykline auffindbar waren und über die Hälfte der VTEC Mehrfachresistenzen aufwiesen. Bei zusammenfassender Betrachtung lassen sich bei VTEC-Stämmen porcinen Ursprungs häufiger Resistenzen ermitteln als bei VTEC boviner Herkunft (BETTELHEIM et al., 2003; VON MÜFFLING et al., 2007). Ein Begründungsansatz für diesen Zustand umfasst die häufigere Anwendung von Antibiotika bei Schweinen (VON MÜFFLING et al., 2007).

Die Verbreitung und der Anstieg von Multiresistenzen bei VTEC-Stämmen animalen Ursprungs und die leichte Übertragungsmöglichkeit antibakteriell unempfindlicher Bakterien auf den Menschen über Lebensmittel liefernde Tiere beweist die Notwendigkeit des reduzierten Einsatzes antimikrobieller Substanzen in der Tierproduktion (VON MÜFFLING et al., 2007).

2.9 Prävention und Surveillance von Resistenzen

Zur Verhinderung der Verbreitung resistenter Keime und von Resistenzgenen besteht die Forderung, nosokomiale Kreuzinfektionen durch adaptierte und standardisierte Hygienemaßnahmen zu unterbinden und den Einsatz antimikrobieller Substanzen zu überwachen sowie zu reduzieren. Der besonnene Gebrauch dieser Pharmaka und ebenso ein Überdenken der Anwendungsnotwendigkeit bei Tieren und in der Landwirtschaft werden postuliert (VON BAUM und MARRE, 2005). Darüber hinaus wird regelmäßig der Anspruch erhoben, Antibiotika lediglich nach erfolgreichem Nachweis des ursächlichen Keims (WALLMANN, 1999) und nur gemäß der Empfindlichkeit des Erregers, in ausreichender Dosierung und über einen genügend langen Zeitraum, anzuwenden (MUTSCHLER et al., 2008). Wünschenswert wäre additiv die Überwachung der Resistenzentwicklung, die Prävention übertragbarer Krankheiten, die Erforschung und Entwicklung neuer Produkte sowie eine internationale Kooperation (MARRE et al., 2002). Empfehlungen werden in Bezug auf das Resistenzmonitoring zudem dahingehend ausgesprochen, eine Verbindung zwischen Human- und Veterinärmedizin aufzubauen und in regelmäßigen Abständen eine externe Beurteilung der Qualität stattfinden zu lassen (WERNER und BRONZWAER, 2007).

Zur Kontrolle des Antibiotikakonsums dient das Europäische Projekt ESAC (European Surveillance of Antimicrobial Consumption), welches durch das ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) finanziert und durch die Universität von Antwerpen (Belgien) koordiniert wird (ESAC, 2008). Für die Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien differierenden Ursprungs sind verschiedene Netzwerke existent. Ein der Resistenzüberwachung bei Menschen dienendes Programm in Deutschland ist das seit 1999 bestehende, nicht staatliche nationale Monitoringprogramm GENARS (German Network on Antimicrobial Resistance Surveillance), welches durch die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), die Paul-Ehrlich-Gesellschaft (PEG) und die Deutsche Gesellschaft für Infektiologie (DGI) ins Leben gerufen wurde und das nach einheitlichem Prinzip gewonnene Daten von Universitätskliniken mit quantitativen Angaben zur Resistenz auswertet (MARRE et al., 2002; RKI, 2007b). Zum Resistenzmonitoring bei Keimen humaner Herkunft in Europa ist seit 1998 das EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) vorhanden, welches durch die Europäische Kommission finanziert wird. Mithilfe dieses Systems werden verlässliche Daten ausgewählter invasiver Keime gesammelt, um die Resistenzdaten zwischen den Ländern vergleichbar zu machen und eine mögliche

Resistenzentwicklung wiederzugeben (OTEO et al., 2002; RKI, 2007b; WERNER und BRONZWAER, 2007). Zur Empfindlichkeitsüberwachung bei Lebensmittel liefernden Tieren in Europa dient das Programm ARBAO II (Antibiotic Resistance in Bacteria of Animal Origin II). Vereinbarte Ziele dieser Gemeinschaft sind der Aufbau eines Netzwerkes von nationalen veterinärmedizinischen Referenzlaboren in den EU-Mitgliedstaaten, die Vereinheitlichung der antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung, die Sammlung und Auswertung der Daten dieser Labore und somit das Erlangen vergleichbarer Ergebnisse der Resistenzlage (ARBAO II, 2008). In Deutschland ist durch die beiden Monitoringprogramme GENARS und EARSS, welche am Robert Koch-Institut koordiniert werden, eine bundesweite und kontinuierliche Kontrolle in der stationären Krankenversorgung möglich, wobei keine repräsentative Aussage für Deutschland getroffen werden kann, da zu wenig Labore teilnehmen. Geplant ist jedoch eine Erneuerung der Überwachung in Deutschland durch das Programm „Antibiotikaresistenz-Surveillance in Deutschland“ (ARS), in dem auch die ambulante Krankenversorgung mit einbezogen werden und eine flächendeckende Aussage möglich sein soll (RKI, 2007b). Im Oktober 2008 wurde in Deutschland erstmals ein Bericht über den „Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin“ vorgestellt. Diese Zusammenstellung ist in Gemeinschaftsarbeit (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG) und Medizinische Universitätsklinik Freiburg) entstanden und umfasst Daten für zahlreiche relevante Infektionserreger sowie den Verbrauch von Antibiotika in den vergangenen Jahren und soll regelmäßig aktualisiert werden (GERMAP, 2008).

Gleichermaßen gibt es in anderen Ländern nationale Surveillanceprogramme. Dazu zählen in Dänemark das Programm DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme), welches zur Überwachung des Antibiotikaverbrauchs bei Menschen und Lebensmittel liefernden Tieren (pathogene, Zoonose- und Indikatorbakterien) dient und die antimikrobielle Resistenz in von Menschen, Lebensmittel liefernden Tieren und Lebensmitteln tierischen Ursprungs kultivierten Stämmen ermittelt (DANMAP, 2008). In den USA ist für die Überwachung enterischer Bakterien das System NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System) zu erwähnen, in Japan das JVARM- (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring) Programm, in Frankreich die AFSSA (l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments), und außer den Genannten sind auch in weiteren Ländern Resistenzüberwachungssysteme vorhanden (AARESTRUP, 2004).

Für das Monitoring von VTEC ist der internationale Verbund Enter-net (Internationales Netzwerk für die Surveillance von humanen gastrointestinalen Infektionserregern) zu erwähnen, welcher durch die Europäische Kommission (EC) und das ECDC finanziert wurde. Durch dieses Programm fand die Überwachung von durch Salmonellen und VTEC O157 ausgelösten Infektionen und deren Resistenzen statt. Am 2. Oktober 2007 erfolgte die Zusammenlegung des Enter-nets mit dem ECDC „food- and waterborne disease“-Programm in Stockholm. ECDC plant die Aufrechterhaltung und Weiterentwicklung dieses Surveillance-Programms (FISHER, 1999; WERNER und BRONZWAER, 2007; ECDC, 2008). Vielfach wird darüber hinaus gefordert, die Verbreitung aller resistenten VTEC-Stämme durch geeignete Monitoringprogramme zu überwachen (FARINA et al., 1996; SCHMIDT et al., 1998; MORA et al., 2005), um mögliche ansteigende Resistenzprobleme zu ermitteln und die öffentliche Gesundheit zu gewährleisten (MORA et al., 2005).

2.10 Methoden zur Durchführung von Empfindlichkeitsprüfungen

2.10.1 Durchführungsvorschriften für Empfindlichkeitsprüfungen

Unabhängig von der zur *in vitro*-Empfindlichkeitsbestimmung gewählten Methode, muss diese einer international anerkannten und standardisierten Durchführungsvorschrift folgen (SCHWARZ et al., 2003). Für die Veterinärmedizin ist nach Ansicht der DVG- (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.) Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ das CLSI-Dokument M31-A2 (NCCLS, 2002) mit dem zugehörigen Supplement M31-S1 (NCCLS, 2004) als der am besten geeignete Standard anzusehen, da hier veterinärmedizinische Grenzwerte zur Bewertung der Ergebnisse Berücksichtigung finden (SCHWARZ et al., 2003). Zur Beurteilung von humanmedizinisch eingesetzten Antibiotika ist auf das Dokument M100-S17 (NCCLS, 2007) zurückzugreifen. Außer den vom amerikanischen CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), ehemals NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), stammenden Durchführungsvorschriften gehören die Richtlinien der BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy, ANDREWS, 2001) in Großbritannien, dem französischen CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2001) und vom Deutschen Institut für Normung e.V. (DIN, 2000) in Deutschland zu den wichtigsten weltweit verwendeten. Die aufgeführten Vorschriften unterscheiden sich in vielen Punkten, wie beispielsweise der technischen Durchführung der

Methoden, den zu verwendenden Inokulumdichten, den für die Erreger empfohlenen Medien, den zur Qualitätssicherung mitzuführenden Kontrollstämmen, den Wirkstoffkonzentrationen der Testplättchen für die Agardiffusion und nicht zuletzt in den Grenzwerten, aufgrund dessen es für keinen Wirkstoff einheitlich geltende, von der verwendeten Methode unabhängige, gültige Grenzwerte gibt (SCHWARZ et al., 2003).

Neben der vom CLSI stammenden Durchführungsrichtlinie M31-A2 (NCCLS, 2002) wird in Deutschland die Durchführungsvorschrift DIN 58940 (2000) vom Deutschen Institut für Normung e.V. angewendet. In diagnostischen Laboren werden hauptsächlich die MHK-Werte-liefernde Mikrodilution und der Agardiffusionstest, welcher eine Einteilung in die drei qualitativen Kategorien „sensibel“, „intermediär-empfindlich“ bzw. „mäßig empfindlich“ und „resistent“ ermöglicht, angewandt. Der sogenannte E-Test, der ebenfalls MHK-Werte liefert und eine Kombination von Agardiffusionstest und Reihenverdünnungstest darstellt, spielt aufgrund der relativ hohen Kosten und der nicht für jeden Wirkstoff verfügbaren Teststreifen in der Routinediagnostik eine lediglich untergeordnete Rolle (SCHWARZ et al., 2003).

2.10.2 Agardiffusionstest

Die Methode des Agardiffusionstests wurde von BAUER et al. (1966) etabliert und ist in Anlehnung an diese Vorschrift im CLSI Dokument M31-A2 beschrieben. Somit liegt eine aktuelle Richtlinie zur standardisierten Durchführung mit den zu verwendenden Grenzwerten vor. Der Agardiffusionstest wird mittels Testplättchen, die mit einer definierten Menge eines antimikrobiellen Wirkstoffes oder einer Wirkstoffkombination beschickt sind, durchgeführt. Diese Plättchen werden auf einen homogen mit einem vorgegebenen Inokulum beimpften Nährboden aufgelegt bzw. mittels eines Dispensers aufgebracht. Das Prinzip beruht auf der Diffusion des Wirkstoffes in den Nährboden, wodurch um das Plättchen herum ein Wirkstoffgradient entsteht. Dieser Wirkstoffgradient ist in unmittelbarer Nähe des Plättchens am höchsten und nimmt Richtung Peripherie ab. Je nach der Empfindlichkeit des zu testenden bakteriellen Keimes wird das Wachstum in einem unterschiedlich großen Radius um das Testplättchen unterdrückt. Die Zone um das Plättchen, in der kein Bakterienwachstum sichtbar ist, wird als Hemmhof bezeichnet und nach der vorgegebenen Inkubationszeit ausgemessen. Der Durchmesser des Hemmhofs (Hemmhofdurchmesser, HHD, angegeben in mm) wird für die Beurteilung herangezogen und kann anhand von den in der jeweiligen Durchführungsvorschrift angegebenen Grenzwerten in einer qualitativen Aussage in Form der

Einteilung in die Kategorien „sensibel“, „intermediär-empfindlich“ und „resistent“ resultieren (SCHWARZ et al., 2003). Abbildung 3 vermittelt einen Eindruck des Resultats eines durchgeführten Agardiffusionstests für einen VTEC-Stamm. Die Resistenz gegen die antimikrobiellen Wirkstoffe ist aus dem fehlenden Hemmhof um die Testplättchen ersichtlich.

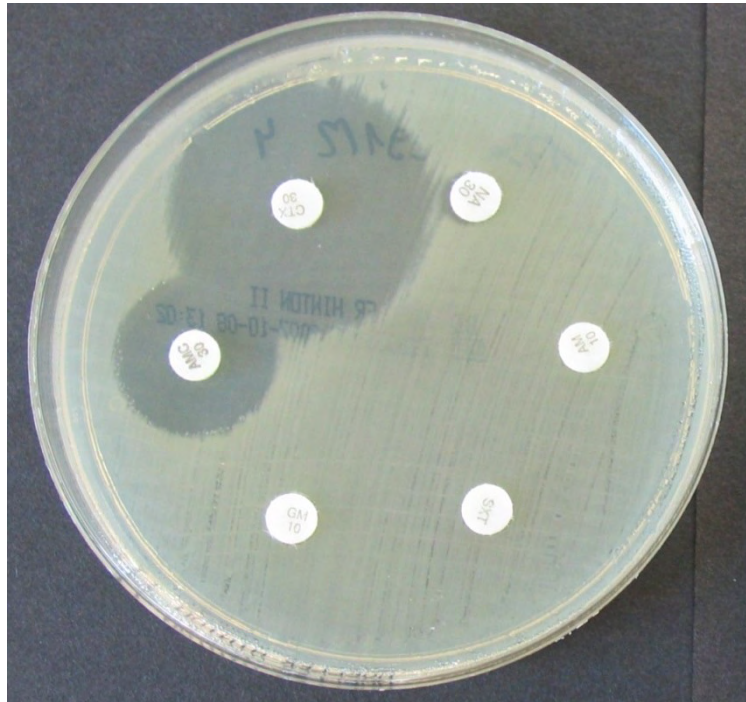


Abbildung 3: Hemmhöfe bei einem durchgeführten Agardiffusionstest zur Resistenzbestimmung bei einem VTEC-Stamm

Erfolgt mit dieser Methode eine Bewertung des getesteten Keimes gegenüber einem antimikrobiellen Chemotherapeutikum als „empfindlich“, ist bei geeigneter pharmakokinetischer Verteilung damit zu rechnen, dass bei Einsatz des geprüften Wirkstoffes ein Therapieerfolg zu erzielen ist. Wird der Erreger als „resistent“ eingeteilt, muss bei Anwendung des Antibiotikums von einem Misserfolg in der Behandlung ausgegangen werden. Unter der Beurteilung eines Keimes als „intermediär-empfindlich“ bzw. „mäßig empfindlich“ ist zu verstehen, dass für eine erfolgreiche Therapie eine höhere Konzentration des Pharmakons nötig wäre, als bei üblicher Dosierung erreichbar ist (SCHWARZ et al., 2003). Bei dem Agardiffusionstest handelt es sich um einen einfach durchzuführenden, kostengünstigen und leicht auszuwertenden Test, bei dem Kontaminationen und Mischkulturen problemlos erkennbar sind. Darüber hinaus sind zeitgleich mehrere Antibiotika auf einer Agarplatte prüfbar. Hinsichtlich der zu testenden Wirkstoffe ist er leicht zu variieren. Als nachteilig zu erwähnen sind die manuelle Beimpfung und die eingeschränkte

Möglichkeit, vom Hemmhofdurchmesser auf die minimale Hemmkonzentration (MHK) zu schließen. Das Ablesen und die Auswertung der Hemmhofdurchmesser sind unter Verwendung von Ablesegeräten und Auswertungssoftwares partiell automatisierbar, so dass die Ergebnisse gespeichert werden können und zu einem späteren Zeitpunkt wieder verfügbar sind (KOLBERT und SHAH, 2002). Aufgrund der einfachen Durchführung und der geringen Kosten findet dieser Test in vielen Routinelaboren Anwendung (SCHWARZ et al., 2003).

2.10.3 Epsilon-Test (E-Test)

Der E-Test, erstmalig von BOLMSTRÖM et al. (1988) beschrieben, gilt als anerkanntes Verfahren zur Bestimmung der Antibiotika-Empfindlichkeit durch Festlegung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) (STOCK et al., 2001) und stellt eine Kombination von Agardiffusionstest und Reihenverdünnungstest dar (SCHWARZ et al., 2003).

Analog zu der Vorgehensweise beim Agardiffusionstest findet die Durchführung dieser Methode auf einem festen Medium statt. Anstelle des mit einer Wirkstoffkonzentration beschickten Testplättchens wird ein mit einem Konzentrationsgradienten eines antimikrobiellen Chemotherapeutikums beschickter Kunststoffstreifen (E-Test-Streifen) verwendet. Die verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen sind auf der dem Antibiotikum entgegengesetzten Seite des Streifens mittels einer Skalierung vermerkt, so dass die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung ablesbar sind. Die Durchführung des E-Tests ist der des Agardiffusionstests weitgehend konform. Nach dem Auflegen des Teststreifens auf einen homogen mit einem vorgegebenen Inokulum beimpften Nährboden diffundieren die in dem Streifen befindlichen unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen in den Agar und erzeugen bei Anwesenheit eines empfindlichen bakteriellen Erregers anstatt eines kreisrunden Hemmhofes eine ellipsoide Hemmzone um den Teststreifen. Der MHK-Wert wird ermittelt, indem die auf dem Streifen befindliche Skala (nach der vorgegebenen Inkubationszeit) an der Stelle abgelesen wird, welche dem Zusammentreffen von Kunststoffstreifen und sichtbarem Bakterienwachstum entspricht. Der E-Test liefert somit im Gegensatz zum Agardiffusionstest quantitative Ergebnisse, ist jedoch arbeits- und zeitintensiver sowie kostenaufwendiger, da pro 90 mm Agarplatte lediglich zwei Teststreifen aufgelegt werden können und die Streifen vergleichsweise teuer sind (KOLBERT und SHAH, 2002; SCHWARZ et al., 2003).

In Abbildung 4 sind Fotos eines durchgeführten E-Tests abgebildet. Anhand der linken Darstellung ist ein gegenüber dem getesteten antimikrobiellen Chemotherapeutikum empfindlicher Stamm ersichtlich, während sich auf der rechten Agarplatte ein resistenter VTEC-Stamm befindet.

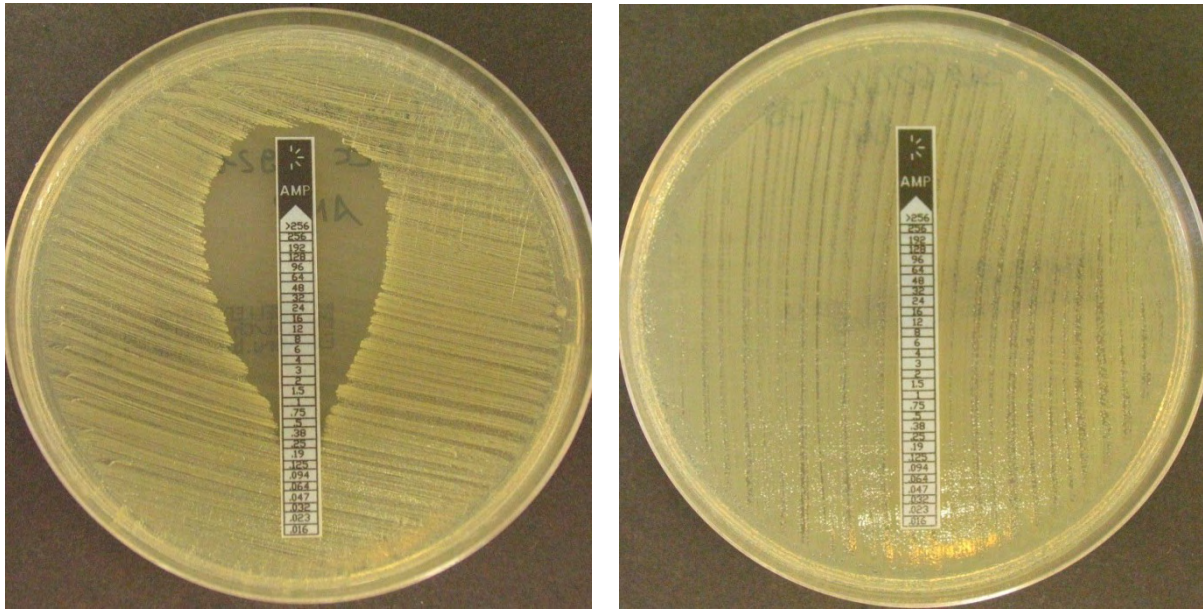


Abbildung 4: Epsilon-Test zur Resistenzbestimmung von VTEC-Stämmen am Beispiel von Ampicillin

2.10.4 Dilutionsmethoden

Die Beurteilung antimikrobieller Empfindlichkeiten unter Bestimmung des MHK-Wertes mittels verschiedener Dilutionstechniken wird als anerkanntes Verfahren angesehen (STOCK et al., 2001). Zu den Dilutionsmethoden, welche in der Durchführungsvorschrift M31-A2 (NCCLS, 2002) beschrieben sind und auch als Reihenverdünnungstests bezeichnet werden, zählen unter Verwendung von flüssigen Medien die **Makrodilution** und die **Mikrodilution** sowie unter Einsatz von festen Medien die **Agardilution**. Bei diesen Methoden wird eine vorgegebene Menge an Keimen gemeinsam mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden Wirkstoffe, häufig in einer zweifachen Verdünnungsreihe, für einen vorgegebenen Zeitraum inkubiert. Die niedrigste Konzentration des antimikrobiellen Wirkstoffes in der definierten Verdünnungsreihe, bei der nach der Bebrütungszeit kein sichtbares Bakterienwachstum erkennbar ist, wird als MHK definiert (SCHWARZ et al., 2003).

Bei der Agardilution finden Platten Verwendung, die jeweils eine bestimmte Verdünnungsstufe eines antimikrobiellen Chemotherapeutikums enthalten. Eine definierte Menge des zu untersuchenden Erregers wird auf die bereits antimikrobiell vorbeschickten Platten aufgebracht, und nach der Inkubationszeit folgt die Bewertung des Bakterienwachstums auf den einzelnen Platten. Für diese Methode ist folglich, wenn auf verschiedene Wirkstoffe und zudem auf viele unterschiedliche Konzentrationen getestet werden soll, eine große Anzahl von Platten notwendig. Bei der Bouillondilution sind in Abhängigkeit von der Menge des Flüssigmediums die „Makrodilution“ und die „Mikrodilution“ zu unterscheiden. Die Durchführung der Makrodilution erfolgt in Reagenzgläsern, während die Mikrodilution unter Verwendung sehr kleiner Volumina (50-100 µl) in Mikrotiterplatten verrichtet wird. Das Wachstum der bakteriellen Erreger ist bei der Makrodilution anhand der Trübung und bei der Mikrodilution durch einen „Knopf“ am Boden der jeweiligen Kavität der Mikrotiterplatte erkennbar. Die bei der Mikrodilution verwendeten meist 96 Kavitäten umfassenden Mikrotiterplatten sind mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Wirkstoffe vorbeschickt und bereits qualitätsgeprüft kommerziell erhältlich und daher auch für die Routinediagnostik zu empfehlen. Die Vorteile der Mikrodilution bestehen in der manuellen und automatischen Durchführbarkeit sowie der Möglichkeit des direkten Ablesens der MHK. Als nachteilig zu erwähnen sind der relativ hohe Kostenaufwand und die fehlende Variabilität der zu testenden Wirkstoffe bei vorgefertigten Mikrotiterplatten. Es besteht die Möglichkeit, Mikrotiterplatten nach eigenen Wünschen mit bestimmten Antibiotika und Konzentrationen vom Hersteller beschicken zu lassen, wobei der Preis pro Platte ansteigt und von der Abnahmemenge abhängig ist. Zudem sind Kontaminationen bzw. Mischkulturen bei der Mikrodilution ebenso wie bei der Makrodilution nicht zu erkennen (STOCK et al., 2001; KOLBERT und SHAH, 2002; NCCLS, 2002).

Mit Hilfe der MHK können anhand von Grenzwerten in den jeweiligen Durchführungsrichtlinien Aussagen über die therapeutische Nutzbarkeit des jeweiligen antimikrobiellen Chemotherapeutikums gegen den getesteten Erreger getroffen werden (STOCK et al., 2001). Somit sind mit diesen Methoden quantitative Aussagen zum Empfindlichkeitsgrad von bakteriellen Keimen möglich. Durch den Vergleich der MHK-Werte mit den zugehörigen Grenzwerten besteht darüber hinaus die Möglichkeit einer Zuordnung in die qualitativen Kategorien „empfindlich“, „intermediär-empfindlich“ und „resistent“ (SCHWARZ et al., 2003).

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Material

3.1.1 Referenzstämme

Zur Qualitätssicherung und Kontrolle der eingesetzten Medien und Antibiotika sowie der durchgeführten Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung (Agardiffusionstest und E-Test) sind im CLSI Dokument M31-A2 (NCCLS, 2002) und dem zugehörigen Supplement M31-S1 (NCCLS, 2004) Referenzstämme vorgegeben. Diese Referenzstämme der „American Type Culture Collection“ (ATCC) wurden in den Empfindlichkeitsbestimmungen dieser Studie mitgeführt. Ein im Supplement M100-S17 (NCCLS, 2007) aufgeführter Kontrollstamm für die Kombination Amoxicillin/Clavulansäure wurde aufgrund der Einbeziehung dieser Wirkstoffe zusätzlich überprüft. In Tabelle 22 sind die bei der Agardiffusions- und der E-Test-Methode getesteten Referenzstämme (NCCLS, 2002; NCCLS, 2004; NCCLS, 2007) aufgelistet.

Tabelle 22: Referenzstämme gemäß Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)

Referenzstämme	Stammbezeichnung
<i>Escherichia coli</i> ATCC®35218	DSM 5923
<i>Escherichia coli</i> ATCC®25922	DSM 1103
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC®29212	DSM 2570
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC®27853	DSM 1117
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®29213	DSM 2569
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®25923	DSM 1104
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC®49619	DSM 11967

3.1.2 VTEC-Prüfstämme aus der institutseigenen Sammlung

Die in dieser Arbeit verwendeten bovinen VTEC-Stämme wurden im Rahmen der Diagnostik und weiterer Studien im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde (IFTN) sowie in diversen anderen Instituten und Einrichtungen in den Jahren 1987 bis 2002 isoliert und (teilweise nach Zulieferung) in der Stammsammlung des IFTN als Gefrierkulturen in Cryoröhrchen (Fa. VWR International) bzw. Cryobanken (Fa. Mast Diagnostika) aufbewahrt.

Die Isolierung und weiterführende biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der Stämme erfolgte nicht im Rahmen der eigenen Arbeiten, vielmehr wurden die in institutseigenen und externen Laboren gewonnenen Daten berücksichtigt. In die Untersuchungen dieser Studie wurden insgesamt 254 VTEC-Stämme einbezogen. Eine Zusammenstellung der bovinen VTEC-Stämme aus Fäzes (114) und Lebensmitteln (140) ist in den Tabellen 23 bis 25 dargestellt. Eine detaillierte Auflistung befindet sich zusätzlich im Anhang (Tabellen 49 und 50).

Tabelle 23: Übersichtstabelle zu einbezogenen VTEC-Stämmen mit Angabe der *vtx*-Gene und des *eae*-Gens

Herkunft	Jahr der Isolation (Anzahl)	<i>vtx1</i> -Gen	<i>vtx2</i> -Gen	<i>vtx1</i> - und <i>vtx2</i> -Gen	kein <i>vtx1</i> - bzw. <i>vtx2</i> -Gen (nur <i>eae</i> -Gen)	<i>eae</i> -Gen
Lebensmittel (n = 140)	1995 (2)	0	1	1	0	1
	1996 (15)	0	6	7	2	5
	1997 (43)	2 (14 n.d. ¹⁾)	18 (1 n.d. ²⁾)	8	15	20
	1998 (20)	3	7	10	0	4
	1999 (35)	0	20	10	5	6
	2000 (6)	0	1	4	1	3
	2001 (13)	4 (2 n.d. ¹⁾)	4 (2 n.d. ²⁾)	3	2	7
	2002 (6)	1 (1 n.d. ¹⁾)	4 (2 n.d. ²⁾)	0	1	6
Summe	1995 - 2002	10 (17 n.d.¹⁾)	61 (5 n.d.²⁾)	43	26	52
Kot (n = 114)	1987 (25)	5	16	4	0	4
	1988 (18)	2	6	10	0	0
	1989 (2)	2	0	0	0	2
	1990 (1)	0	1	0	0	1
	1993 (1)	1	0	0	0	1
	1994 (2)	2	0	0	0	2
	1996 (27)	9	6	12	0	11
	1997 (12)	2	3	5	2	7
	1999 (5)	1	4	0	0	5
	2000 (8)	0	3	5	0	0
	2001 (13)	0	12	1	0	12
Summe	1987 - 2001	24	51	37	2	45
Summe Lebensmittel und Kot (n = 254)	1987 - 2002	34 (17 n.d.¹⁾)	112 (5 n.d.²⁾)	80	28	97

¹⁾ Keine Testung auf VT1-Bildungsvermögen bei der angegebenen Anzahl von Stämmen

²⁾ Keine Testung auf VT2-Bildungsvermögen bei der angegebenen Anzahl von Stämmen

Tabelle 24: Übersichtstabelle zu einbezogenen VTEC-Stämmen aus Lebensmitteln bovinen Ursprungs mit Angabe der *vtx*-Gene und des *eae*-Gens

Herkunft	Jahr der Isolation (Anzahl)	<i>vtx</i> 1-Gen	<i>vtx</i> 2-Gen	<i>vtx</i> 1- und <i>vtx</i> 2-Gen	kein <i>vtx</i> 1- bzw. <i>vtx</i> 2-Gen (nur <i>eae</i> -Gen)	<i>eae</i> -Gen
Rindfleisch- rohstoffe für Fertigprodukte (FP)	1996 (3)	0	2	1	0	0
	1997 (17)	2	8	6	1	2
	1998 (13)	2	4	7	0	2
	1999 (23)	0	11	7	5	5
	2000 (2)	0	0	2	0	1
	2001 (4)	2	0	2	0	2
Summe	1996-2001 (62)	6	25	25	6	12
Rindfleisch- FP	1999 (10)	0	8	2	0	1
	2000 (2)	0	1	0	1	1
	2001 (5)	1 (2 n.d. ¹⁾)	3 (1 n.d.)	0	0	3
	2002 (2)	1 (1 n.d.)	(2 n.d.)	0	0	2
Summe	1999-2002 (19)	2 (3 n.d.)	12 (3 n.d.)	2	1	7
Rindfleisch-FP ungewürzt	2002 (4)	0	4	0	0	4
Rindfleisch	1996 (2)	0	1	1	0	1
	1997 (1)	0	1	0	0	1
	2000 (1)	0	0	1	0	1
	2001 (3)	1	(1 n.d.)	1	1	2
Summe	1996-2001 (7)	1	2 (1 n.d.)	3	1	5
Tatar	2000 (1)	0	0	1	0	0
	2001 (1)	0	1	0	0	0
Summe	2000-2001 (2)	0	1	1	0	0
Rinderhack- fleisch	1996 (6)	0	0	4	2	2
	1997 (21)	0 (14 n.d.)	6 (1 n.d.)	1	0	14
	1998 (6)	1	2	3	0	1
	1999 (1)	0	1	0	0	0
Summe	1996-1999 (34)	1 (14 n.d.)	9 (1 n.d.)	8	2	17
Milch	1995 (2)	0	1	1	0	1
	1996 (4)	0	3	1	0	2
	1997 (3)	0	2	1	0	3
	1998 (1)	0	1	0	0	1
	1999 (1)	0	0	1	0	0
Summe	1995-1999 (11)	0	7	4	0	7
Rohmilchkäse	1997 (1)	0	1	0	0	0
Summe Lebensmittel	1995-2002 (140)	10 (17 n.d.)	61 (5 n.d.)	43	26	52

¹⁾ keine Testung auf VT 1- bzw. VT 2-Bildungsvermögen bei angegebener Anzahl von Stämmen

Tabelle 25: Übersichtstabelle zu einbezogenen VTEC-Stämmen aus Fäzes bovinen Ursprungs mit Angabe der *vtx*-Gene und des *eae*-Gens

Herkunft	Jahr der Isolation (Anzahl)	<i>vtx1</i> -Gen	<i>vtx2</i> -Gen	<i>vtx1</i> - und <i>vtx2</i> -Gen	kein <i>vtx1</i> - bzw. <i>vtx2</i> -Gen (nur <i>eae</i> -Gen)	<i>eae</i> -Gen
Kälberkot	1989 (2)	2	0	0	0	2
	1990 (1)	0	1	0	0	1
	1993 (1)	1	0	0	0	1
	1994 (2)	2	0	0	0	2
	1996 (10)	1	2	7	0	1
Summe	1989-1996 (16)	6	3	7	0	7
Rinderkot	1987 (25)	5	16	4	0	4
	1988 (18)	2	6	10	0	0
	1996 (17)	8	4	5	0	10
	1997 (12)	2	3	5	2	7
	1999 (5)	1	4	0	0	5
	2000 (8)	0	3	5	0	0
	2001 (13)	0	12	1	0	12
Summe	1987-2001 (98)	18	48	30	2	38
Summe Kälber- und Rinderkot	1987-2001 (114)	24	51	37	2	45

3.1.3 Auswahl der antimikrobiellen Wirkstoffe

Bei den zur Empfindlichkeitsprüfung mittels Agardiffusion in der eigenen Arbeit eingesetzten antimikrobiellen Wirkstoffen handelt es sich um Substanzen wie Aminopenicilline (Ampicillin, Amoxicillin) und die Kombination Sulfamethoxazol/Trimethoprim (Cotrimoxazol), die in der Humanmedizin bei durch *E. coli* (EIEC, EPEC, ETEC und EHEC) ausgelösten Magen-Darm-Infektionen junger Säuglinge und immundefizienter Patienten sowie bei Verdacht auf eine systemische Infektion genutzt werden können (SCHOLZ et al., 2002). Desweiteren wurden Antibiotika wie Fluorchinolone (Ciprofloxacin, Levofloxacin) und ebenso Cotrimoxazol mit einbezogen, die häufig bei der Behandlung von durchfallkranken Kindern und Erwachsenen eingesetzt werden (ZHANG et al., 2000; ANDREOLI et al., 2002) und außerdem für zukünftige Behandlungen bei EHEC-bedingten Infektionen vorgesehene Wirkstoffe wie Carbapeneme (TAKAHASHI et al., 1997), Tetrazykline (ITO et al., 1997), Ampicillin und Fluorchinolone (KURIOKA et al., 1999; SAWAMURA et al., 1999; SHIOMI et al., 1999; YOSHIMURA et al., 1999). Ferner wurden Substanzen überprüft,

gegen welche VTEC-Stämme bereits bei früheren Untersuchungen teilweise (Ampicillin, Gentamicin, Nalidixinsäure, Tetrazykline) bzw. keine oder nur sehr selten (Cephalosporine der zweiten [Cefuroxim] und dritten [Cefotaxim] Generation) Resistenzen aufwiesen (FARINA et al., 1996; SCHMIDT et al., 1998; MORA et al., 2005; WALSH et al., 2006).

Zusammenfassend wurden Wirkstoffe berücksichtigt, gegen die bei *E. coli* häufig Resistenzen vorliegen, da sie bei Infektionen mit diesen Erregern zum Einsatz kommen (Aminopenicilline, Cotrimoxazol, Fluorchinolone, Cephalosporine, Carbapeneme und Aminoglykoside) (KRESKEN, et al., 1999) und die gemäß Infektionsschutzgesetz bei *E. coli*-Stämmen getestet werden sollten (Meropenem, Ciprofloxacin, Cefotaxim) (WITTE et al., 2004). Eine Auflistung der im Agardiffusionstest verwendeten antimikrobiellen Chemotherapeutika (Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) mit Angabe der Testplättchenbeschickung ist in Tabelle 26 zusammengestellt.

Tabelle 26: Belegung der im Agardiffusionstest verwendeten Antibiotika-Testplättchen

Wirkstoff	Konzentration (µg)	Bestellnummer
Ampicillin (AM)	10	231264
Amoxicillin/Clavulansäure (AMC)	20 + 10	231629
Cefotaxim (CTX)	30	231607
Cefuroxim (CXM)	30	231621
Ciprofloxacin (CIP)	5	231658
Gentamicin (GM)	10	231299
Levofloxacin (LVL)	5	231705
Meropenem (MEM)	10	231704
Nalidixinsäure (NA)	30	231311
Sulfamethoxazol/Trimethoprim (Cotrimoxazol, SXT)	23,75 + 1,25	231539
Tetrazyklin (TE)	30	231344

Weiterhin fand mithilfe der E-Test-Methode (Teststreifen: Fa. Oxoid, Wesel bzw. Fa. Inverness Medical Deutschland GmbH, Köln) eine Testung aller Antibiotika (Tabelle 27) statt, gegen die bei den untersuchten VTEC-Stämmen bovinen Ursprungs Resistenzen zum Vorschein kamen bzw. das Ergebnis „mäßig empfindlich“ erzielt wurde. Auf diese Weise sollten zum Einen MHK-Werte bestimmt und zum Anderen das mittels der Agardiffusions-Methode ermittelte Ergebnis verifiziert bzw. falsifiziert werden.

Tabelle 27: Verwendete Antibiotika-Teststreifen für die E-Test-Methode

Wirkstoff	Konzentration (µg/ml)	Bestellnummer
Ampicillin	0,016-256	MA0110F
Amoxicillin/Clavulansäure	2/1; 0,016-256	MA0107D
Gentamicin	0,064-1024	MA0117D
Nalidixinsäure	0,016-256	16V01650
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	1/19; 0,002-32	16V02440
Tetrazyklin	0,016-256	16V02250

3.1.4 Medien und Lösungen

Sowohl für die Vorversuche (Ermittlung der optischen Dichte zur Einstellung des Inokulums) als auch für die Durchführung der Empfindlichkeitsprüfungen (Agardiffusionstest und E-Test) wurden die in Tabelle 28 aufgeführten Medien und Lösungen verwendet.

Tabelle 28: Medien und Lösungen

Medium/Lösung	Herstellung	Firma	Artikel- bzw. Bestell- nummer
Columbia-Blut-Agar	Für 1 Liter Agar: 39 g Agar Basis, Zusatz von 5-10 % (bzw. 50 ml) Schafblut	-	
Columbia-Blut-Agar-Basis	-	Oxoid, Wesel	CM0331B
Schafblut, defibriniert	-	Oxoid, Wesel	SR0051C
Plate Count- (PC-) Agar	-	Merck, Darmstadt	1.05463.0500
Brain Heart- (BHI-) Bouillon	-	Merck, Darmstadt	1.10493.0500
Müller-Hinton-Agar-Platten	-	Oxoid, Wesel	PO5007A
Müller-Hinton-Agar-Platten mit Blut	-	Oxoid, Wesel	PB5007A
Glycerin	-	Merck, Darmstadt	1.04094.2500
McFarland Standard		Biomerieux, Nürtingen	70900
Verdünnungslösung	1,0 g Pepton, 8,5 g NaCl ad Aqua dest.	-	-
Pepton (Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut)	-	Merck, Darmstadt	1.07213.2500
Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %)	0,9 g NaCl + Aqua bidest. 100 ml	Merck, Darmstadt	1.06404.5000

3.1.5 Geräte und Labormaterialien

Tabelle 29: Geräte

Gerätbezeichnung	Typ	Firma	Seriennummer
Autoklav	Varioklav 500E	H+P Labortechnik, Oberschleissheim	
BD Sensi Disc™- Dispenser	für 6 Kartuschen (90 mm Petrischalen)	Becton Dickinson, Heidelberg	
Brutschränke	Memmert BVW 50K	Memmert GmbH und Co KG, Schwabach	964012/964021
	BE 800		e895.0107
	BKE 50		890063
Dampfsterilisator	Varioklav H+P 500EP	H+P Labortechnik, Oberschleissheim	5900 1096/2313
Eppendorf Reference variabel	100-1000 µl	Eppendorf-Netheler- Hinz, Hamburg	369533
Flüssigkeitsdispenser	Perifill IQ 2000	Zinsser Analytik, Frankfurt	0386
Gefrierschrank	GS 5203 Comfort 410934	Liebherr-Haustechnik GmbH	74.000.839.7
Kühlschrank	FKS 5000, 200071	Liebherr-Haustechnik GmbH	70.595.364.9
Kühlzelle	TE 900*2030*60	Vissmann, Allendorf	TE-11
Labor-Spülautomat	G 7883	Miele Professional	
Magnetrührer mit Heizplatte	RCT basic	Janke & Kunkel, Staufen	821792
Minischüttler	MS 1 Minishaker	Janke & Kunkel, Staufen	004127
pH-Meter	Microprocessor- Präzisions-pH/mV- Meter 539	WTW, Weilheim	43202044
Plattenabfüllgerät	Technomat 125	Integra Bioscience, Fernwald	2784
Reagenzglasschüttler	VM-300	NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg	409432
Reinigungsautomat	25-06	Gilowy/Riebesam, Essen	5479
Sicherheitsbrenner	Gasi Nr. 3.340102	Schütt Labortechnik, Göttingen	95239/95240
Spektralphotometer	Modell U-2000	Hitachi	9557-005
Tiefkühlagertruhe	HFC 586 Top Freezer	Kendro Laboratory Products GmbH	51019566
Tischautoklav	Agarklav 10	Integra Bioscience, Fernwald	132.981105
Trockenschrank (Heißluftsterilisator)	FED 400	WTC Binder GmbH	910010
UV-Lampe	5135	Original Hanau Quarzlampengesellschaft	408036

Tabelle 30: Labormaterialien

Materialienbezeichnung	Typ/Größe/ Volumen	Firma	Bestellnummer
Bag Clips (Verschluß)	für Stomacherbeutel 400	Meintrup DWS Laborgeräte, Lähden	ME 001500
Baumwollwattestäbchen		Medka Medizin- produkte, Berlin	316843
CO ₂ -Compact		Oxoid, Wesel	CD 20
Cryoröhrchen	Qualilab- Cryoröhrchen, 2 ml	VWR Darmstadt	4794503
Cryobank		Mast Diagnostika, Reinfeld	
Cryobank Aufbewahrungsbox		Mast Diagnostika, Reinfeld	
Desinfektionsmittel	Gigasept Instru AF		107412
	Desmanol industrial	Schülke und Mayr, Norderstedt	109424
	Buraton rapid		113912
Einmalhandschuhe	Touch NT-Nitril	Ansell, München	
Einmalpapierhandtücher		Torx	
Esemtan Waschlotion		Schülke und Mayr, Norderstedt	116604
Esemtan Hautbalsam		Schülke und Mayr, Norderstedt	109602
Filter-Tips PE/PP natur	100-1000 µl	Nerbe plus, Winsen	07.692.5300
Impfösenhalter		VWR, Darmstadt	631-0621
Küvetten	4 ml, 1 x 1 cm, PS	Sarstedt, Nümbrecht	67.741
Labocap-Kappen	15-16 mm, silber	VWR, Darmstadt	391--0094
Messpipetten	1 und 10 ml	VWR, Darmstadt	
Metallspatel		Roth, Karlsruhe	-
Petrischalen mit Enthüllungsnocken	92 x 16 mm	Nerbe plus, Winsen	09.0131.000
Pinzetten		Roth, Karlsruhe	
Platinösen	0,5 mm/ID 3 mm	VWR, Darmstadt	631-7122
Reagenzgläser	160 x 16 x 0,8-1,0	VWR, Darmstadt	212-0031
Reagenzglasständer	2 x 6; 2 x 12; 3 x 12	VWR, Darmstadt	
Schieblehre	Taschen-Mess- Schieber-Duo-Fix	Conrad, Hirschau	
Sicherheits-Pipettierball	(Peleusball)	VWR, Darmstadt	612-1947
Sterile Probenbeutel (Stomacherbeutel) 400	Modell GRADE	Meintrup DWS Laborgeräte, Lähden	ME 001015
Verschlussfolien	Parafilm [®] M	VWR, Darmstadt	291-1212

3.2 Methoden

3.2.1 Methode zur Einstellung der Bakteriendichte

Für die zur Durchführung der Empfindlichkeitsprüfungen vorzunehmende Beimpfung der Agarplatten wird gemäß dem CLSI-Dokument M31-A2 (NCCLS, 2002) eine Bakterien-suspension mit einem Trübungsstandard nach McFarland von 0,5 empfohlen. Die diesem Standard entsprechende Trübung enthält ca. $1 \text{ bis } 2 \times 10^8 \text{ KfE/ml}$. Bei Verwendung eines Spektralphotometers mit einem Lichtweg von 1 cm ist für diese Bakteriendichte bzw. diesen Trübungsstandard die Absorption bei 625 nm zwischen 0,08 und 0,10 beschrieben (NCCLS, 2002; MURRAY et al., 2003). Um mit einem solchen standardisierten Inokulum zu arbeiten, wurde in Vorversuchen die vorgegebene Bakteriendichte mit Hilfe der photometrischen Bestimmung und des Tropfplattenverfahrens ermittelt. Die Durchführung dieser Versuche erfolgte mit jeweils drei VTEC-Stämmen pro eingestellter optischer Dichte (0,08; 0,1; 0,15 und 0,2), jeweils im Doppelansatz und mit dreimaliger Wiederholung pro Stamm. Ebenso wurde auch mit den Referenzstämmen verfahren; mit jedem der sieben Referenzstämme wurden die Versuche dreimal pro eingestellter optischer Dichte durchgeführt. Die ausführliche Vorgehensweise ist den folgenden Schritten zu entnehmen.

Tag 1: Kulturelle Anzucht der zu prüfenden Stämme: Zunächst erfolgte eine Auswahl der zu untersuchenden Stämme (insgesamt 12 VTEC- und alle Referenzstämme) aus der institutseigenen Stammsammlung. Daran schloss sich die Entnahme von Material aus den Cryoröhrchen bzw. Cryobanken mithilfe einer Impföse und die Überführung in Brain-Heart-(BHI-) Bouillon an. Die Reagenzglasröhrchen mit BHI-Bouillon wurden nach Homogenisierung mittels Vortex-Mixer (Minischüttler, Reagenzglasschüttler) für 20 bis 24 Stunden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen (der Referenzstamm *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 in einer Umgebung mit 5 % CO₂ durch Verwendung von sterilen Probenbeuteln, CO₂ Compact und Bag Clips [zum Verschluss der Beutel]) inkubiert.

Tag 2: Überimpfung der zu prüfenden Stämme: Am folgenden Tag wurde aus der bebrüteten BHI-Bouillon Material mithilfe einer Impföse im Dreiösen-Ausstrich auf eine Blutplatte (Columbia-Blut-Agar) kultiviert. Diese Blutplatten wurden wiederum für 20 bis 24 Stunden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen (*Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 in 5 % iger CO₂-Umgebung) inkubiert.

Tag 3: Einstellung auf Absorptionen und Herstellung von Verdünnungsreihen: An Tag drei fand eine Selektion von vier bis fünf Kolonien desselben morphologischen Typs von der jeweiligen Blutplatte statt. Mit einer Öse wurde das Bakterienmaterial nachfolgend in ein Röhrchen mit 5 ml Kochsalzlösung eingerieben. Daran schloss sich die Homogenisierung dieser Suspension mittels Vortex-Mixer, die Überführung von ca. 3 ml in eine 4 ml-Küvette und die Einstellung des nun in der Küvette befindlichen Materials auf die Absorptionen bei 625 nm von 0,08, 0,1, 0,15 und 0,2 mittels eines Spektralphotometers an. Ergab sich ein zu niedriger Messwert, wurde eine größere Menge Koloniematerial in die Suspension gegeben, nochmals homogenisiert und die Absorption gemessen. Erwies sich die Trübung dagegen als zu stark, wurde noch etwas Kochsalzlösung hinzugegeben, erneut homogenisiert und mittels Spektralphotometer gemessen.

Von der eingestellten Suspension wurde je 1 ml entnommen, in 9 ml Verdünnungslösung gegeben und nachfolgend ausreichend homogenisiert. Anschließend wurde auf gleiche Weise eine dekadische Verdünnungsreihe bis zur Stufe 10^{-8} angelegt. Aus den Verdünnungsstufen 10^{-5} bis 10^{-8} wurden jeweils 100 µl auf die entsprechenden Sektoren der Plate Count- (PC-) Agar-Platten (Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-9}) aufgetragen und anschließend mit der verwendeten Pipette gleichmäßig auf dem Sektor verteilt. Nachdem die Flüssigkeit auf dem Medium getrocknet war, schloss sich die Inkubation der PC-Agar-Platten für 18 (VTEC- und Referenzstämmen) bzw. 24 Stunden (*Streptococcus pneumoniae* ATCC®49619; 5 % ige CO₂-Atmosphäre) bei 35 °C an.

Parallel wurde ein steriler Baumwollwattetupfer in die eingestellten Ausgangssuspensionen (Absorptionen bei 625 nm: 0,08, 0,1, 0,15 und 0,2) getaucht und durch das nachfolgende Andrücken gegen die innere Wand der Küvette oberhalb des Flüssigkeitsstandes überflüssiges Inokulum abgepreßt. Mit diesem Tupfer wurde die gesamte Oberfläche einer PC-Agar-Platte gleichmäßig ausgestrichen. Die Indikation für dieses methodische Vorgehen war die Überprüfung der vorgegebenen konfluenten bzw. nahezu konfluenten Wachstumsfläche bei der jeweiligen optischen Dichte.

Tag 4: Auswertung der Platten: Nach der Inkubationszeit von 18 bzw. 24 Stunden erfolgte die Auswertung der Platten. Dazu wurden jeweils die Sektoren aufeinanderfolgender Verdünnungsstufen ausgezählt, die zwischen fünf und 100 Kolonien (BAUMGART, 2002) aufwiesen und anschließend das Ergebnis anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \times 1 + n_2 \times 0,1} \times d$$

\bar{c} : gewichteter Mittelwert der Koloniezahlen

$\sum c$: Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen wurden

n_1 : Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe

n_2 : Anzahl der Platten der nächst höheren Verdünnungsstufe

d : Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe; hierbei handelt es sich um die auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe

In Abbildung 5 ist ein Beispiel der Anwendung dieser Formel bei vorliegendem Versuch dargestellt.

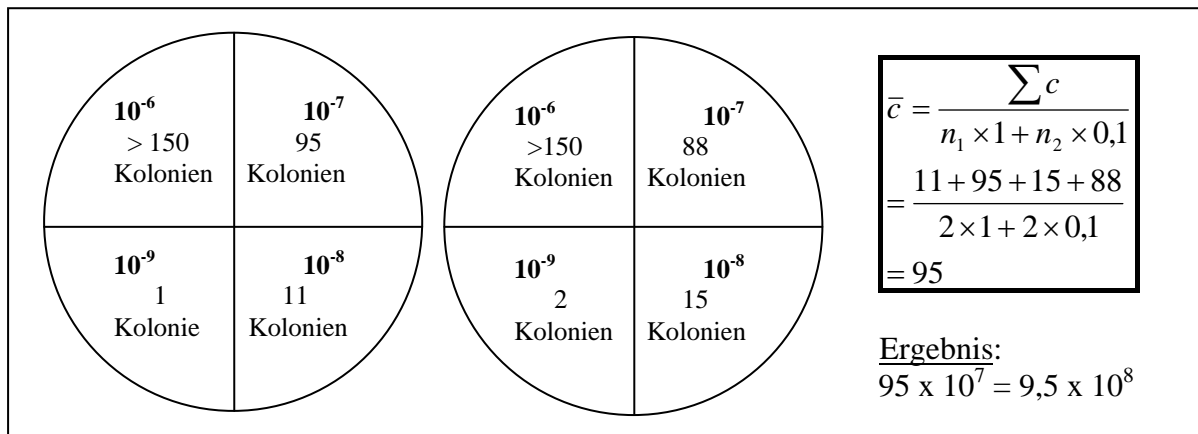


Abbildung 5: Berechnungsbeispiel zur Erfassung der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE)

Aufgrund der mit diesen Vorversuchen (Errechnung von Mittelwerten) erzielten Ergebnisse, die aufgeschlüsselt in Kapitel 4.1 veranschaulicht sind, wurden alle VTEC- und ebenso die mitgeführten Referenzstämmen auf eine Absorption von 0,1 bei 625 nm eingestellt.

3.2.2 Anzüchtung der VTEC- und Referenzstämmen

Die kulturelle Anzucht der VTEC- und der mitgeführten Referenzstämmen für die Empfindlichkeitsprüfungen wurde an Tag eins vollzogen. Dazu erfolgten die Entnahme von Material aus den Gefrierkulturen der Cryoröhrchen bzw. Cryobanken mithilfe einer Impföse und die Überführung in BHI-Bouillon. Nach Homogenisierung mittels Vortex-Mixer fand die

Inkubation der Reagenzglasröhrchen für 20 bis 24 Stunden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen (der Referenzstamm *Streptococcus pneumoniae* ATCC®49619 wie beschrieben in einer Umgebung mit 5 % CO₂) statt. Am Tag zwei schlossen sich die Entnahme von Material mit einer Öse aus der BHI-Bouillon nach durchgeführter Homogenisierung mittels Vortex-Mixer sowie das Aufbringen auf eine Blutplatte (Columbia-Blut-Agar) an. Diese Blutplatten wurden wiederum für 20 bis 24 Stunden aerob bei 37 °C (*Streptococcus pneumoniae* ATCC®49619 in einer 5 % igen CO₂-Umgebung) bebrütet, so dass am Tag drei die Empfindlichkeitsprüfungen stattfinden konnten.

3.2.3 Agardiffusion

Die Agardiffusion erfolgte gemäß den Empfehlungen der Durchführungsrichtlinie M31-A2 der CLSI (NCCLS, 2002) zur Resistenzbestimmung bei veterinärmedizinisch relevanten Bakterien für Routineempfindlichkeitsprüfungen. Es wurde dieses Routineverfahren gewählt, da die Durchführung dieser Methode in Instituten und Kliniken zum Großteil auf diese im CLSI-Dokument beschriebene, standardisierte Weise erfolgt. Die zur Qualitätssicherung der Agardiffusion empfohlenen Referenzstämme wurden bei den Versuchsdurchgängen mitgeführt, um so den Versuchsablauf und alle verwendeten Medien sowie die antimikrobiellen Wirkstoffe zu überprüfen. Nur unter der Voraussetzung, dass die Werte dieser Referenzstämme mit den für sie vorgegebenen Werten des CLSI-Dokuments M31-A2 (NCCLS, 2002) übereinstimmten, wurden die Versuchsdurchgänge gewertet.

Die Einstellung des Inokulums auf eine Bakteriendichte von 1 bis 2 x 10⁸ KBE/ml für die Durchführung der Agardiffusion fand, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, statt. Vom gewünschten Ergebnis abweichende Bakteriendichten wurden durch Zugabe von NaCl bzw. Koloniematerial in die Suspension, abschließendem Homogenisieren und erneuter Überprüfung der Absorption mittels Spektralphotometer korrigiert. Zusätzlich erfolgte ein optischer Vergleich der Trübung mit dem kommerziell erworbenen Standard nach McFarland (Fa. Biomerieux, Nürtingen) von 0,5.

Die Entnahme der eingestellten Suspension erfolgte wie bereits in Kapitel 3.2.1 dargestellt mittels eines sterilen Baumwollwattetupfers. Mit diesem Wattetupfer wurde daraufhin über die gesamte Oberfläche der Müller-Hinton-Agar-Platte (bei Referenzstamm *Streptococcus pneumoniae* ATCC®49619 Verwendung einer Müller-Hinton-Agar-Platte mit Blut)

gestrichen; gleichzeitig wurde die Platte mehrfach gedreht, um eine gleichmäßige Beimpfung sicherzustellen. Abschließend erfolgte noch eine kreisrunde Drehung am gesamten Rand der Platte, um auch diesen ausreichend zu erfassen. Nach dem Aufbringen der Suspension auf die Agarplatten schloss sich das Ruhen bei geschlossenem Deckel für drei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur und das anschließende Aufbringen der Testplättchen mittels Dispenser auf die Müller-Hinton-Agar-Platten an. Dabei wurden jeweils sechs Testplättchen pro Platte verwendet. Die Auswahl der aufgetragenen Testplättchen ist Tabelle 26 (s. S. 91) zu entnehmen. Nachfolgend fand die aerobe Bebrütung dieser Agarplatten für 16 bis 18 Stunden bei 35 °C statt. Die Müller-Hinton-Agar-Platten mit Blutzusatz des Referenzstammes *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619 wurden dagegen 20 bis 24 Stunden bei 35 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ inkubiert.

Nach Abschluss der Bebrütung erfolgte die Bestimmung der Hemmhofdurchmesser mithilfe einer Schieblehre. In Tabelle 31 sind die Hemmhofbewertungsschlüssel für *Enterobacteriaceae* (zur Beurteilung der VTEC-Stämme) und in Tabelle 32 für die Referenzstämme gemäß den CLSI-Vorschriften (NCCLS, 2002; 2004; 2007) wiedergegeben.

Tabelle 31: Hemmhofbewertungsschlüssel für *Enterobacteriaceae*

Antimikrobieller Wirkstoff	Konzentration (µg)	Hemmhofdurchmesser (mm)		
		Resistent (R)	Intermediär (I)	Sensibel (S)
Ampicillin (AM)	10	≤ 13	14-16	≥ 17
Amoxicillin/Clavulansäure (AMC)	20 + 10	≤ 13	14-17	≥ 18
Cefotaxim (CTX)	30	≤ 14	15-22	≥ 23
Cefuroxim (CXM)	30	≤ 14	15-17	≥ 18
Ciprofloxacin (CIP)	5	≤ 15	16-20	≥ 21
Gentamicin (GM)	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Levofloxacin (LVL)	5	≤ 13	14-16	≥ 17
Meropenem (MEM)	10	≤ 13	14-15	≥ 16
Nalidixinsäure (NA)	30	≤ 13	14-18	≥ 19
Sulfamethoxazol/Trimethoprim (Cotrimoxazol, SXT)	23,75 + 1,25	≤ 10	11-15	≥ 16
Tetrazyklin (TE)	30	≤ 14	15-18	≥ 19

Tabelle 32: Hemmhofbewertungsschlüssel für Referenzstämme

Anti-mikrobieller Wirkstoff	Konzentration (µg)	<i>E. coli</i> ATCC® 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	<i>E. coli</i> ATCC® 35218
AM	10	16-22	27-35	-	30-36	-
AMC	20 + 10	18-24	28-36	-	-	17-22
CTX	30	29-35	25-31	18-22	-	-
CXM	30	20-26	27-35	-	-	-
CIP	5	30-40	22-30	25-33	-	-
GM	10	19-26	19-27	16-21	-	-
LVL	5	29-37	25-30	19-26	-	-
MEM	10	28-34	29-37	27-33	-	-
NA	30	22-28	-	-	-	-
SXT	23,75 + 1,25	23-29	24-32	-	20-28	-
TE	30	18-25	24-30	-	27-31	-

3.2.4 Epsilon-Test

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der im Agardiffusionstest als „resistent“ oder „intermediär-empfindlich“ bzw. „mäßig empfindlich“ beurteilten bovinen VTEC-Stämme erfolgte mithilfe des E-Tests. Für die Durchführung dieser Methode wurden antimikrobiell vorbeschickte Teststreifen (Fa. Oxoid bzw. Fa. Inverness Medical Deutschland GmbH) kommerziell erworben. Die mittels der E-Test-Methode getesteten Substanzen sind in Tabelle 27 (s. S. 92) detailliert (mit Wirkstoffgradienten) aufgelistet. Analog zum Agardiffusionstest wird diese Methode auf einem festen Medium (Müller-Hinton-Agar-Platten) durchgeführt. Die zur Qualitätssicherung der Empfindlichkeitsprüfung mit MHK-Bestimmung vorgegebenen Referenzstämme wurden bei den Versuchsdurchgängen mitgeführt, um wiederum den Versuchsablauf, alle verwendeten Medien und ebenso die antimikrobiellen Wirkstoffe zu überprüfen. Hier wurden die Versuchsdurchgänge ebenfalls nur dann gewertet, wenn die ermittelten MHK-Werte dieser Referenzstämme mit den für sie vorgegebenen Grenzwerten des CLSI-Dokuments M31-A2 (NCCLS, 2002) übereinstimmten.

Die kulturelle Anzucht der VTEC- sowie der Referenzstämmen erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 abgehandelt. Die Vorbereitung des Inokulums fand wie für die Agardiffusion beschrieben statt, so dass eine Bakteriendichte von 1 bis 2×10^8 KBE/ml (McFarland-Standard von 0,5) eingestellt wurde. Die Entnahme der eingestellten Suspension sowie die Überführung auf die Müller-Hinton-Agar-Platten (bei Referenzstamm *Streptococcus pneumoniae* ATCC®49619 Verwendung von Müller-Hinton-Agar-Platten mit Blut) erfolgte wie bereits in Kapitel 3.2.1 dargestellt. Nach dem Aufbringen des Inokulums auf die Agarplatten blieben diese bei geschlossenem Deckel zwischen drei und fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wurden die Kunststoffstreifen mittels im Vorfeld dekontaminierter Pinzette auf den inokulierten Agar aufgelegt und leicht angedrückt, wobei darauf geachtet wurde, den Teststreifen nach dem Auflegen nicht mehr zu verschieben und keine Luftblasen zwischen dem Agar und dem Streifen entstehen zu lassen. An diese Schritte schloss sich die Bebrütung der Platten für 16 bis 18 Stunden bei 35 °C unter aeroben Bedingungen (*Streptococcus pneumoniae* ATCC®49619 20 bis 24 Stunden in 5 % iger CO₂-Atmosphäre) an.

Nach erfolgter Inkubation war bei Anwesenheit eines empfindlichen Erregers eine ellipsoide Hemmzone um den Teststreifen erkennbar, wohingegen sich bei einem resistenten Stamm die Hemmzone als kleiner oder gar nicht ausgeprägt darstellte (s. Abb. 4, S. 85). Anhand der Skalierung des Teststreifens wurden die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung in Form von MHK-Werten (µg/ml) am Schnittpunkt des sichtbaren Bakterienwachstums mit dem Kunststoffstreifen abgelesen. In Tabelle 33 sind die Standards zur Interpretation der MHK-Grenzwerte für *Enterobacteriaceae* zur Beurteilung der VTEC-Stämme und in Tabelle 34 für die Referenzstämmen gemäß den CLSI-Vorschriften (NCCLS, 2002; 2004; 2007) angegeben.

Tabelle 33: Standards zur Interpretation der MHK-Werte für *Enterobacteriaceae*

Antimikrobieller Wirkstoff	Konzentration (µg/ml)	MHK-Grenzwert (µg/ml)		
		Resistent (R)	Intermediär (I)	Sensibel (S)
Ampicillin (AM)	0,016-256	≥ 32	16	≤ 8
Amoxicillin/Clavulansäure (AMC)	2/1; 0,016-256	≥ 32*/16	16*/8	≤ 8*/4
Gentamicin (GM)	0,064-1024	≥ 16	8	≤ 4
Nalidixinsäure (NA)	0,016-256	≥ 32	-	≤ 16
Sulfamethoxazol/Trimethoprim (Cotrimoxazol, SXT)	1/19; 0,002-32	≥ 76/4*	-	≤ 38/2*
Tetrazyklin (TE)	0,016-256	≥ 16	8	≤ 4

*: bei der Herstellerfirma angegeben

Tabelle 34: Qualitätskontrollbereiche der MHK-Werte für Referenzstämme

Anti- mikrob. Wirkst. ¹⁾	Konz. ²⁾ (µg)	<i>Staphylo- coccus aureus</i> ATCC® 29213	<i>Entero- coccus faecalis</i> ATCC® 29212	<i>E. coli</i> ATCC® 25922	<i>Pseudo- monas aeruginosa</i> ATCC® 27853	<i>Strepto- coccus pneumoniae</i> ATCC® 49619	<i>E. coli</i> ATCC® 35218
AM	0,016-256	0,5-2	0,5-2	2-8	-	0,06-0,25	-
AMC	2/1; 0,016-256	0,12/0,06- 0,5/0,25	0,25/0,12- 1,0/0,5	2*/1- 8*/4	-	0,03*/0,016- 0,12*/0,06	4*/2- 16*/8
GM	0,064-1024	0,12-1	4-16	0,25-1	0,5-2	-	-
NA	0,016-256	-	-	1-4	-	-	-
SXT	1/19; 0,002-32	≤ 9,5/ 0,5	≤ 9,5/ 0,5	≤ 9,5/ 0,5*	152/8- 608/32	2/0,12*- 19/1*	-
TE	0,016-256	0,12-1	8-32	0,5-2	8-32	0,12-0,5	-

¹⁾ Antimikrobieller Wirkstoff²⁾ Konzentration

*: Angabe durch Herstellerfirma

3.2.5 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und –auswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0 (DIXON, 1993), dem Programm BiAS für Windows (ACKERMANN, 1998) sowie einem Eigenprogramm der

Arbeitsgruppe Biomathematik für die Berechnung des „Exakten Tests von Fisher“ durchgeführt.

Der statistische Vergleich der Resistenzhäufigkeiten zwischen verschiedenen Antibiotika (Test auf Symmetrie) fand mithilfe des Symmetrie-Tests nach McNemar (FLEISS, 1973) statt. Dabei wurde das Programm BiAS (ACKERMANN, 1998) eingesetzt. Der ebenfalls vollzogene statistische Vergleich der Resistenzprävalenzen zwischen den verschiedenen Matrices (Lebensmittel und Fäzes) der Tierart Rind erfolgte standardmäßig mit dem Chi-Quadrat (χ^2 -) Test (SACHS, 1997). Erwiesen sich einzelne Erwartungswerte als zu niedrig, fand der „Exakte Test von Fisher“ (FELDMANN und KLINGER, 1963; SACHS, 1997) Anwendung, wobei in beiden Fällen die Testverfahren mit dem Programm BiAS (ACKERMANN, 1998) gerechnet wurden.

Die statistische Prüfung auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den vorhandenen Virulenzfaktoren der getesteten VTEC-Stämme und den verifizierten Resistenzhäufigkeiten wurde bezüglich des Verotoxin-Bildungsvermögens mithilfe des „Verallgemeinerten Exakten Tests von Fisher“ und im Falle der Betrachtung des *eae*-Gen-Vorkommens mittels des χ^2 -Tests (SACHS, 1997) durchgeführt, wobei zur Berechnung dieses Testverfahrens wiederum das Programm BiAS (ACKERMANN, 1998) verwendet wurde.

Der statistische Test auf Homogenität der bei den VTEC-Stämmen detektierten Resistenzhäufigkeiten zwischen den aufgestellten Beobachtungszeiträumen erfolgte mithilfe des „Verallgemeinerten Exakten Tests von Fisher“ (Eigenprogramm der Biomathematik). Zusätzlich wurde für diese Fragestellung eine logistische Regression mit dem Programm BMDPLR (DIXON, 1993) angestellt, um die Resistenzdaten der einbezogenen VTEC-Stämme bovinen Ursprungs auf das Vorhandensein eines zeitlichen Trends in den einbezogenen Beobachtungsjahren zu überprüfen.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Einstellung der Bakteriendichte

Die dem Trübungsstandard nach McFarland von 0,5 (gemäß dem CLSI-Dokument M31-A2 vorgegeben; NCCLS, 2002) entsprechende Bakteriensuspension beläuft sich auf 1 bis 2×10^8 KbE/ml, wobei bei Verwendung eines Spektralphotometers mit einem Lichtweg von 1 cm die Absorption für diese Keimdichte bei 625 nm zwischen 0,08 und 0,10 liegen sollte (NCCLS, 2002; MURRAY et al., 2003).

Um mit einem solchen standardisierten Inokulum zu arbeiten, wurde in Vorversuchen die vorgegebene Bakteriendichte mithilfe der photometrischen Bestimmung und des Tropfplattenverfahrens ermittelt. Der Wert eines Stammes des im Doppelansatz durchgeführten Experiments wurde mit der in Kapitel 3.2.1 aufgeführten Formel berechnet. Pro eingestellter Absorption (0,08; 0,1; 0,15 und 0,2) kamen drei unterschiedliche VTEC-Stämme zum Einsatz, und je Stamm wurde der Versuch dreimal wiederholt. Auf diese Weise ergab sich aus insgesamt neun (drei Stämme, dreimalige Durchführung pro Stamm) Werten ein Durchschnittswert der vorliegenden Keimdichte pro Absorption, so dass nachfolgend die optische Dichte, bei der das Inokulum am ehesten der vorgegebenen Bakteriendichte ($1 \text{ bis } 2 \times 10^8$ KbE/ml) entsprach, ausgewählt werden konnte. Die durchschnittlichen Werte für die verschiedenen Absorptionen sind in Tabelle 35 und ausführlich im Anhang (Tabelle 47, S. 193) wiedergegeben.

Tabelle 35: Ergebnisse der durchschnittlichen Keimdichte der VTEC-Stämme

Optische Dichte bei 625 nm	Durchschnittliche Bakteriendichte (KbE/ml) ¹⁾
0,08	$7,6 \times 10^7$
0,10	$1,5 \times 10^8$
0,15	$1,8 \times 10^8$
0,20	$2,4 \times 10^8$

¹⁾ Kolonie-bildende Einheiten/ml

Aus diesen Resultaten ergab sich für eine optimale Einstellung der Bakteriendichte auf 1 bis 2×10^8 KbE/ml die Absorption von 0,1 bei 625 nm für alle VTEC-Stämme. Für die

Referenzstämme wurden diese Vorversuche ebenfalls durchgeführt, um eine dem vorgegebenen Trübungsstandard (McFarland 0,5) entsprechende Keimdichte zu erlangen. Hierzu wurde jeder Stamm im Doppelansatz dreimal pro Absorption (0,08; 0,1; 0,15 und 0,2) getestet, so dass sich nachfolgende Durchschnittswerte von drei einzelnen Werten pro Referenzstamm und optische Dichte ergaben. Die Durchschnittswerte für die unterschiedlichen Absorptionen sind Tabelle 36 und ausführlich dem Anhang (Tabelle 48, S. 194-195) zu entnehmen.

Tabelle 36: Ergebnisse der durchschnittlichen Keimdichte der Referenzstämme

Referenzstamm	Optische Dichte bei 625 nm	Durchschnittliche Bakteriendichte (KbE/ml)
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218	0,08	$9,2 \times 10^7$
	0,10	$1,2 \times 10^8$
	0,15	$1,7 \times 10^8$
	0,20	$2,2 \times 10^8$
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	0,08	$7,8 \times 10^7$
	0,10	$1,4 \times 10^8$
	0,15	$1,7 \times 10^8$
	0,20	$1,8 \times 10^8$
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	0,08	$8,0 \times 10^7$
	0,10	$1,1 \times 10^8$
	0,15	$1,6 \times 10^8$
	0,20	$1,9 \times 10^8$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	0,08	$1,0 \times 10^7$
	0,10	$1,2 \times 10^8$
	0,15	$1,8 \times 10^8$
	0,20	$3,6 \times 10^8$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	0,08	$8,5 \times 10^7$
	0,10	$1,3 \times 10^8$
	0,15	$1,7 \times 10^8$
	0,20	$2,2 \times 10^8$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	0,08	$8,3 \times 10^7$
	0,10	$1,2 \times 10^8$
	0,15	$1,4 \times 10^8$
	0,20	$2,1 \times 10^8$
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	0,08	$5,0 \times 10^7$
	0,10	$1,1 \times 10^8$
	0,15	$1,3 \times 10^8$
	0,20	$1,9 \times 10^8$

Aufgrund dieser Ergebnisse fiel auch bei den Referenzstämmen die Entscheidung auf eine Absorption von 0,1 bei 625 nm.

Das Wachstum der Bakterien erwies sich auf den mit sterilen Wattetupfern beimpften Platten bei den Absorptionen 0,08; 0,1 und 0,15 wie vorgegeben als konfluent; bei dem Messwert von 0,2 waren die Platten bereits zu stark bewachsen. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass die Einstellung auf eine Absorption von 0,1 bei 625 nm auch mit dem vorgegebenen Wachstum auf der Platte in Einklang zu bringen ist.

Somit wurden sowohl die VTEC-Stämme als auch die bei den Empfindlichkeitsprüfungen mitgeführten Referenzstämmen auf die gleiche optische Dichte von 0,1 bei 625 nm (Absorption) eingestellt. Mit diesem Inokulum fand daraufhin die Beimpfung der Müller-Hinton-Agar-Platten (*Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619: mit Blutzusatz) mittels sterilem Tupfer für beide Empfindlichkeitsprüfungen statt.

4.2 Agardiffusion

Die Auswertung der mittels Schieblehre ausgemessenen Hemmhofdurchmesser erfolgte gemäß den im CLSI-Dokument M31-A2 (NCCLS, 2002) sowie den Supplementen M31-S1 (NCCLS, 2004) und M100-S17 (NCCLS, 2007) angegebenen Grenzwerten, woraufhin eine Einteilung in die Kategorien „sensibel“, „intermediär-empfindlich“ und „resistent“ vorgenommen werden konnte. Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 254 VTEC-Stämme bovinen Ursprungs (140 Stämme aus Lebensmittel- und 114 Stämme aus Kotproben) mithilfe der Agardiffusionsmethode auf ihre Empfindlichkeit untersucht. Alle VTEC-Stämme wurden auf Resistenzen gegenüber den 11 ausgewählten antimikrobiellen Wirkstoffen Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Cotrimoxazol, Cefotaxim, Cefuroxim, Ciprofloxacin, Gentamicin, Levofloxacin, Meropenem, Nalidixinsäure und Tetrazyklin getestet.

Wie nachfolgend Tabelle 37 zu entnehmen ist, wurden bei 24 (17,1 %) der 140 aus Lebensmitteln sowie bei 13 (11,4 %) der 114 aus Kot isolierten Stämme, also insgesamt bei 37 VTEC-Stämmen bovinen Ursprungs, Resistenzen festgestellt. Zusätzlich erwies sich ein Stamm aus Kot als „mäßig empfindlich“.

Tabelle 37: Auflistung unempfindlicher VTEC-Stämme mit Angabe der Isolationsjahre

Herkunft	Jahr der Isolierung	Anzahl der getesteten Stämme	Anzahl der sensiblen Stämme (%)	Anzahl der resistenten Stämme (%)	Anzahl der intermediär-empfindlichen Stämme (%)
Lebensmittel (n = 140)	1995	2	2 (100)	0	0
	1996	15	13 (86,7)	2 (13,3)	0
	1997	43	37 (86,0)	6 (14,0)	0
	1998	20	18 (90,0)	2 (10,0)	0
	1999	35	26 (74,3)	9 (25,7)	0
	2000	6	6 (100)	0	0
	2001	13	9 (69,2)	4 (30,8)	0
	2002	6	5 (83,3)	1 (16,7)	0
Summe	1995-2002	140	116 (82,9)	24 (17,1)	0
Kot (n = 114)	1987	25	25 (100)	0	0
	1988	18	18 (100)	0	0
	1989	2	0	2 (100)	0
	1990	1	0	1 (100)	0
	1993	1	0	1 (100)	0
	1994	2	0	2 (100)	0
	1996	27	22 (81,5)	4 (14,8)	1 (3,7)
	1997	12	9 (75,0)	3 (25,0)	0
	1999	5	5 (100)	0	0
	2000	8	8 (100)	0	0
	2001	13	13 (100)	0	0
Summe	1987-2001	114	100 (87,7)	13 (11,4)	1 (0,9)
Summe Lebensmittel und Kot (n = 254)	1987-2002	254	216 (85,0)	37 (14,6)	1 (0,4)

Unempfindlichkeiten ließen sich gegen sechs Antibiotika nachweisen. Dazu gehören die Aminopenicilline Ampicillin und die Kombination Amoxicillin/Clavulansäure ebenso wie das Aminoglykosid Gentamicin, die Sulfamethoxazol/Trimethoprim-Kombination Cotrimoxazol, das Chinolon Nalidixinsäure sowie das Tetracyclin. Dagegen erwiesen sich alle Stämme gegenüber fünf Wirkstoffen als sensibel. Aufzuführen sind unter diesem Gesichtspunkt die Cephalosporine zweiter und dritter Generation, nämlich Cefuroxim und Cefotaxim, die Fluorchinolone Ciprofloxacin und Levofloxacin sowie das Carbapenem Meropenem. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 6 illustriert.

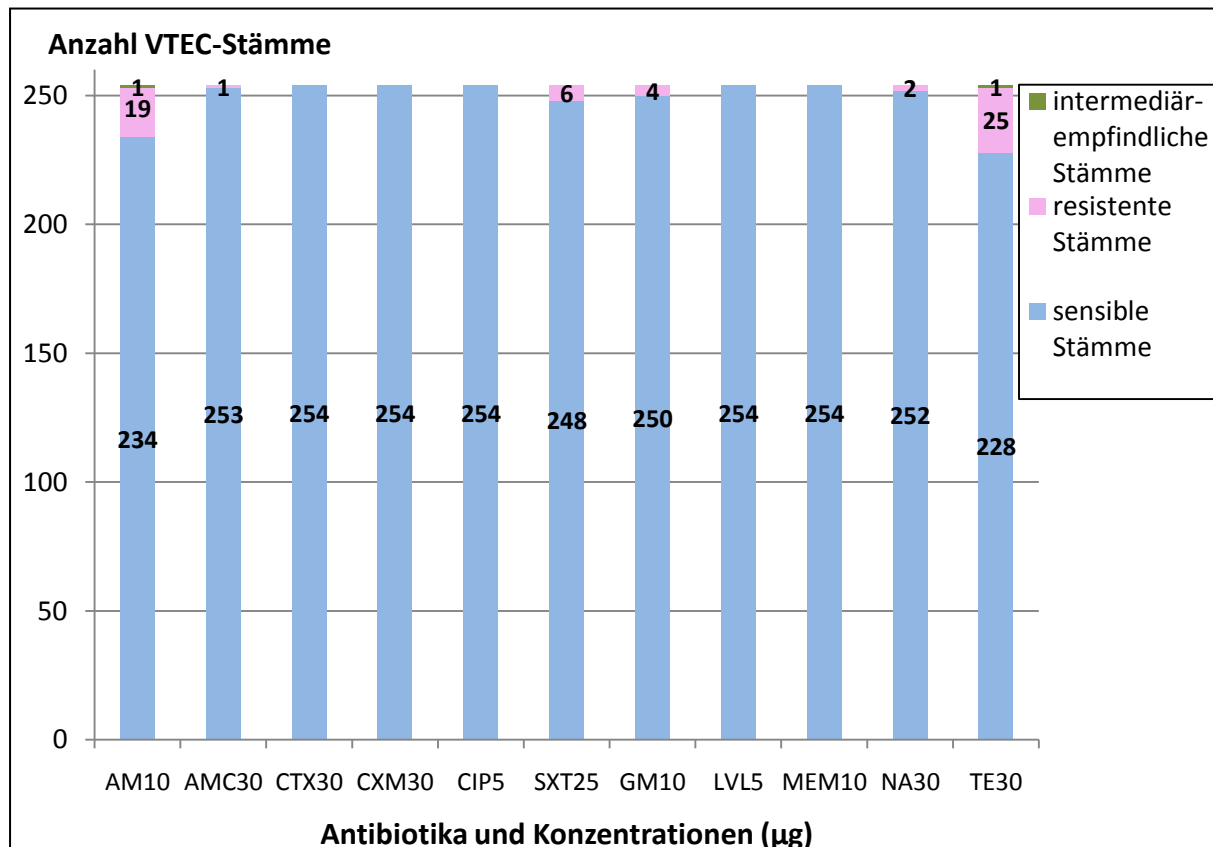


Abbildung 6: Ergebnisse der mittels Agardiffusion gegenüber 11 Antibiotika getesteten VTEC-Stämme

Bei 23 (20 aus Lebensmittel- und drei aus Kotproben) der 254 untersuchten VTEC-Stämme war eine Resistenz gegenüber einem antimikrobiellen Wirkstoff auffindig zu machen; diese wurden als „einfach resistente“ Stämme benannt. Bei 13 bovinen VTEC zeigte sich desweiteren eine Resistenz gegen zwei oder mehr Antibiotika; diese Stämme wurden als „mehrfach resistent“ bezeichnet. Insgesamt erwiesen sich neun VTEC jeweils gegenüber zwei Antibiotika als resistent (6 x gegen Ampicillin und Tetrazyklin; 1 x gegen Gentamicin und Tetrazyklin; 2 x gegen Sulfamethoxazol/Trimethoprim). Ein Stamm zeigte eine Resistenz gegen drei antimikrobielle Chemotherapeutika (Ampicillin, Cotrimoxazol und Tetrazyklin) und drei VTEC gegen vier Wirkstoffe (2 x gegen Ampicillin, Gentamicin, Nalidixinsäure und Tetrazyklin; 1 x gegen Ampicillin, Gentamicin, Cotrimoxazol und Tetrazyklin). Ein gegenüber der Kombination Amoxicillin/Clavulansäure resistenter Stamm aus Kot ergab zusätzlich eine mäßige Empfindlichkeit gegen Ampicillin, und bei einem weiteren VTEC-Stamm aus dieser Matrix wurde lediglich eine „einfach intermediär-empfindliche“ Wirkung gegenüber Tetrazyklin verzeichnet. Eine Zusammenstellung dieser Erhebungen ist den Abbildungen 7 und 8 zu entnehmen.

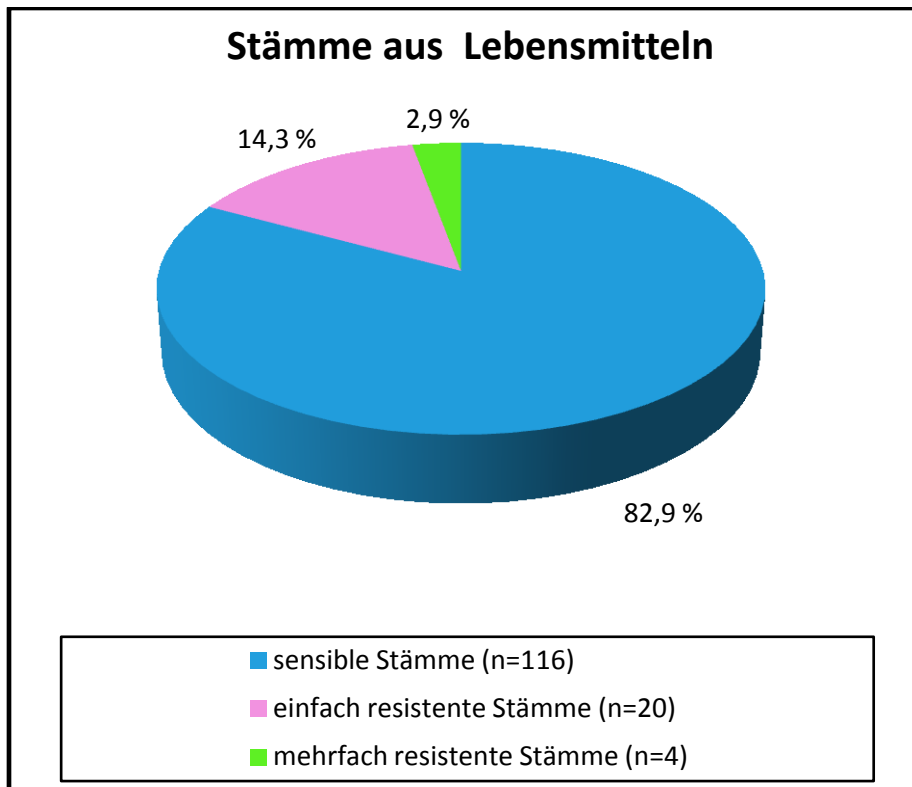


Abbildung 7: Darstellung einfach und mehrfach resistenter Stämme aus Lebensmitteln

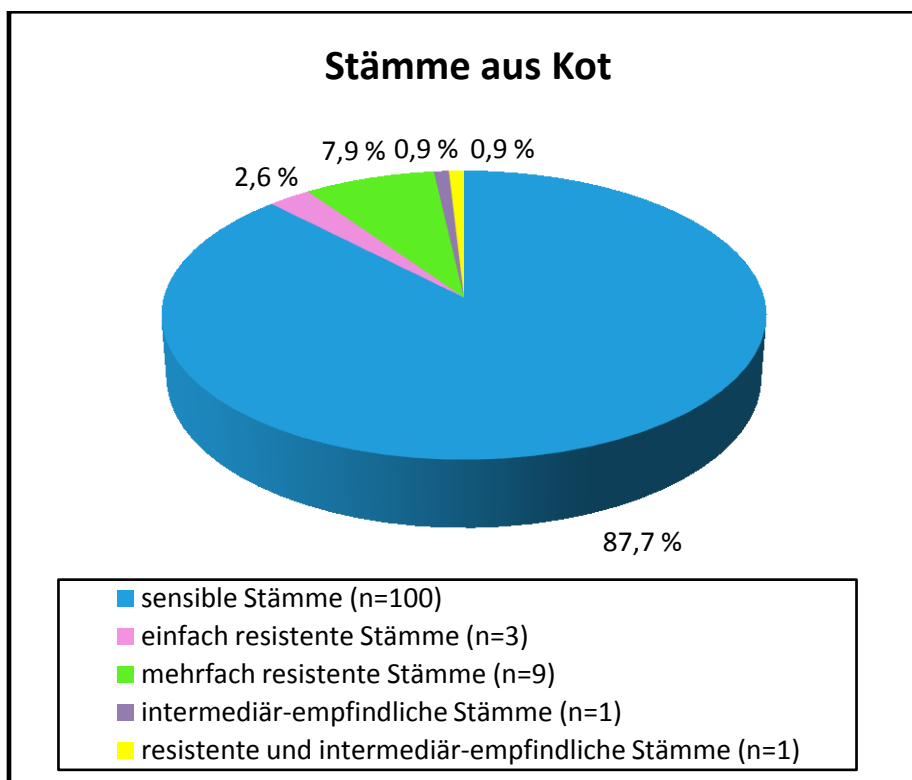


Abbildung 8: Darstellung einfach und mehrfach resistenter sowie mäßig empfindlicher Stämme aus Kot

Am häufigsten ließen sich Unempfindlichkeiten gegenüber den antimikrobiellen Wirkstoffen Tetrazyklin und Ampicillin nachweisen. So wurden 20 (7,5 % resistent, 0,4 % intermediär-empfindlich) der Stämme gegen Ampicillin als resistent bzw. mäßig empfindlich ermittelt (10 aus Lebensmittel- und 10 aus Kotproben). Gegenüber Tetrazyklin wiesen 26 (9,8 % resistent, 0,4 % intermediär-empfindlich) der Stämme eine Resistenz bzw. eine mäßige Empfindlichkeit auf (14 aus Lebensmittel- und 12 aus Kotproben). Zusätzlich ließen sich bei vier aus Lebensmitteln und zwei aus Fäzes kultivierten VTEC-Stämmen (2,4 %) Resistenzen gegenüber der Kombination Cotrimoxazol feststellen; vier (1,6 %) aus bovinem Kot isolierte Stämme erwiesen sich als resistent gegen Gentamicin und zwei (0,8 %) gegen Nalidixinsäure. Zudem war bei einem (0,4 %) VTEC fäkalen Ursprungs eine Resistenz gegen die Kombination Amoxicillin/Clavulansäure zu detektieren.

Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Resistenzen und dem Vorhandensein von Virulenzfaktoren (*vtx1*-, *vtx2*-, *vtx1*- und *vtx2*-Gen, *eae*-Gen) ist aus Tabelle 38 ersichtlich.

Tabelle 38: Auflistung unempfindlicher VTEC-Stämme mit Pathogenitätsfaktoren

Herkunft	Jahr der Isolierung (Anzahl)	intermediär-empfindliche bzw. resistente Stämme	<i>vtx1</i> -Gen	<i>vtx2</i> -Gen	<i>vtx1</i> - & <i>vtx2</i> -Gen	kein <i>vtx1</i> - oder <i>vtx2</i> -Gen (nur <i>eae</i>)	<i>eae</i> -Gen
Lebensmittel (n=140)	1995 (2)	0	0	0	0	0	0
	1996 (15)	2	0	0	1	1	1
	1997 (43)	6	1	4	1	0	1
	1998 (20)	2	0	0	2	0	1
	1999 (35)	9	0	7	2	0	0
	2000 (6)	0	0	0	0	0	0
	2000 (6)	0	0	0	0	0	0
	2001 (13)	4	1 (1 n.d.) ¹⁾	3	0	0	1
	2002 (6)	1	1	0 (1 n.d.) ¹⁾	0	0	1
Summe	1995 - 2002	24	3 (1 n.d.)	14 (1 n.d.)	6	1	5
Kot (n=114)	1987 (25)	0	0	0	0	0	0
	1988 (18)	0	0	0	0	0	0
	1989 (2)	2	2	0	0	0	2
	1990 (1)	1	0	1	0	0	1
	1993 (1)	1	1	0	0	0	1
	1994 (2)	2	2	0	0	0	2
	1996 (27)	5	3	0	2	0	5
	1997 (12)	3	2	1	0	0	2
	1999 (5)	0	0	0	0	0	0
	2000 (8)	0	0	0	0	0	0
	2001 (13)	0	0	0	0	0	0
Summe	1987 - 2001	14	10	2	2	0	13
Summe Lebensmittel und Kot (n=254)	1987 - 2002	38	13 (1 n.d.)	16 (1 n.d.)	8	1	18

¹⁾ Testung auf *vtx* bei einem Stamm nicht durchgeführt

Dieser Tabelle ist zu entnehmen, dass 16 VT 2- und 13 VT 1-Bildner unter den unempfindlichen VTEC-Stämmen gefunden wurden, wobei bei jeweils einem Stamm kein Test auf *vtx1* bzw. *vtx2* durchgeführt wurde. Es ließen sich acht Stämme ausfindig machen,

die das Bildungsvermögen für beide Toxintypen besitzen und lediglich ein Stamm, der weder *vtx1* noch *vtx2* aufwies (nur das *eae*-Gen). Insgesamt war bei 18 der unempfindlichen VTEC das *eae*-Gen zu finden. Eine Auflistung der Virulenzfaktoren der einzelnen VTEC-Stämme ist im Anhang tabellarisch dargestellt (Tabellen 49 und 50).

Die mithilfe der Agardiffusionsmethode ermittelten „resistenten“ und „mäßig empfindlichen“ VTEC-Stämme wurden nachfolgend mittels der E-Test-Methode erneut getestet. Die durch den Agardiffusionstest als unempfindlich identifizierten VTEC-Stämme sind gemeinsam mit den ermittelten MHK-Werten in den Tabellen 39 und 40 veranschaulicht.

4.3 Epsilon-Test

Wie bereits erwähnt, wurden die mittels der Agardiffusionsmethode bestimmten „resistenten“ und „intermediär-empfindlichen“ VTEC-Stämme mit der E-Test-Methode mithilfe von kommerziell erworbenen, antimikrobiell vorbeschickten Kunststoff-Teststreifen und unter Verwendung von Müller-Hinton-Agar-Platten nochmals getestet, um einerseits den MHK-Wert zu analysieren und somit ein quantitatives Ergebnis zu erlangen und weiterhin die Ergebnisse der Agardiffusionsmethode mit einem weiteren Testverfahren zu verifizieren. Bezüglich der MHK-Werte überstiegen alle gegen Ampicillin resistenten Stämme den maximal ablesbaren Wert von 256 µg/ml auf der Konzentrations-Gradientenskala; ausgenommen ist lediglich der intermediär-empfindliche Stamm (16 µg/ml). Ebenso übertrafen alle Cotrimoxazol-resistenten Stämme den größten Skalenwert von 32 µg/ml. Bei den gegenüber Tetrazyklin resistenten Stämmen lagen die Werte zwischen 64 und über dem Maximalwert von 256 µg/ml (mäßig empfindlicher Stamm: 8 µg/ml) und bei den gegen Gentamicin unempfindlichen VTEC zwischen 24 und 384 µg/ml. Die Nalidixinsäure-resistenten Stämme wiesen Werte von 192 und über dem höchsten ablesbaren Wert von 256 µg/ml auf, und bei dem gegen Amoxicillin/Clavulansäure resistenten Stamm lag der Wert bei 64 µg/ml.

Die mittels der Agardiffusion und des E-Tests (MHK-Werte) ermittelten Ergebnisse für die einbezogenen VTEC-Stämme sind in den Tabellen 39 und 40 zusammengestellt.

Tabelle 39: MHK-Werte der VTEC-Stämme aus bovinen Fäzes

Serovar	Herkunft	Jahr	Ergebnis	
			Agardiffusion	E-Test (µg/ml)
O118:H ⁻	Kälberkot	1993	R ¹⁾ : AM ²⁾	R: AM ≥ 256
O118:H ⁻	Kälberkot	1994	R: AM, TE ³⁾	R: AM ≥ 256 R: TE 64
O118:H ⁻	Kälberkot	1994	R: AM, SXT ⁴⁾ , TE	R: AM ≥ 256 R: SXT ≥ 32 R: TE 32
O118:H ⁻	Kälberkot	1989	R: AM, GM ⁵⁾ , SXT, TE	R: AM ≥ 256 R: GM 384 R: SXT ≥ 32 R: TE 64
O118:H ⁻	Kälberkot	1989	R: GM, TE	R: GM 24 R: TE 96
"OX ⁶⁾ 177":H ⁺	Kälberkot (Enteritis)	1990	R: TE	R: TE ≥ 256
O26:H ⁺	Rinderkot	1997	R: TE	R: TE ≥ 256
O111:H2	Rinderkot	1996	R: AM, GM, TE, NA	R: AM ≥ 256 R: GM 192 R: TE ≥ 256 R: NA 192
O111:H ⁻	Rinderkot	1996	R: AM, GM, TE, NA ⁷⁾	R: AM ≥ 256 R: GM 256 R: TE ≥ 256 R: NA ≥ 256
O103:H2	Rinderkot	1996	I ⁸⁾ : TE	I: TE 8
O118:H ⁻	Rinderkot	1996	R: AM, TE	R: AM ≥ 256 R: TE 96
O118:H ⁻	Rinderkot	1996	R: AM, TE	R: AM ≥ 256 R: TE 96
O118:H ⁻	Rinderkot	1997	R: AM, TE	R: AM ≥ 256 R: TE ≥ 256
O155:H ⁻	Rinderkot	1997	R: AMC ⁹⁾ ; I: AM	R: AMC 64 I: AM 16

¹⁾ Resistent⁴⁾ Cotrimoxazol⁷⁾ Nalidixinsäure²⁾ Ampicillin⁵⁾ Gentamicin⁸⁾ Intermediär-empfindlich³⁾ Tetrazyklin⁶⁾ nicht klassifiziert (unclassified)⁹⁾ Amoxicillin/Clavulansäure

Tabelle 40: MHK-Werte der VTEC-Stämme aus Lebensmitteln bovinen Ursprungs

Serovar	Herkunft	Jahr	Ergebnis	
			Agardiffusion	E-Test (µg/ml)
O7:H16/ Ont. ¹⁾ :H16	Rindfl.r. f. FP ²⁾	1997	R ³⁾ : SXT ⁴⁾ , TE ⁵⁾	R: SXT ≥ 32 R: TE 64
O22:H8	Rindfl.r. f. FP	1998	R: AM ⁶⁾ , TE	R: AM ≥ 256 R: TE ≥ 256
O91:H21	Rindfl.r. f. FP	1999	R: AM	R: AM ≥ 256
O109:H4/ Ont.:H4	Rindfl.r. f. FP	1999	R: AM	R: AM ≥ 256
O113:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1997	R: TE	R: TE ≥ 256
O113:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1997	R: SXT, TE	R: SXT ≥ 32 R: TE 64
O113:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1998	R: TE	R: TE 96
O157:H7	Rindfl.r. f. FP	1997	R: AM	R: AM ≥ 256
Ont.:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1999	R: TE	R: TE ≥ 256
Osp. ⁷⁾ :H4	Rindfl.r. f. FP	1999	R: AM	R: AM ≥ 256
Ont:H10	Rindfl.r. f. FP	2001	R: AM, TE	R: AM ≥ 256 R: TE 64
O103:H2	Rindfl. FP ⁸⁾	2002	R: SXT	R: SXT ≥ 32
O109:H4	Rindfl. FP	1999	R: AM	R: AM ≥ 256
O109:H4	Rindfl. FP	1999	R: AM	R: AM ≥ 256
O113:H4	Rindfl. FP	1999	R: SXT	R: SXT ≥ 32
O113:H ⁺	Rindfl. FP	2001	R: TE	R: TE ≥ 256
O157:H ⁺	Rindfl. FP	2001	R: AM	R: AM ≥ 256
Ont.:H4	Rindfl. FP	1999	R: AM	R: AM ≥ 256
OX ⁹⁾ 3:NM	Tatar	2001	R: TE	R: TE 128
O8:H ⁻	Rinderhackfl. ¹⁰⁾	1997	R: TE	R: TE 96
O8:H ⁻	Rinderhackfl.	1997	R: TE	R: TE 64
O22:H5	Rinderhackfl.	1996	R: TE	R: TE 96
O113:H4	Rinderhackfl.	1999	R: TE	R: TE ≥ 256
On.t.:H ⁻	Rinderhackfl.	1996	R: TE	R: TE ≥ 256

¹⁾ nicht typisierbar (nontypeable)³⁾ Resistent⁵⁾ Tetrazyklin⁷⁾ O-specific polysaccharide⁹⁾ nicht klassifiziert (unclassified)²⁾ Rindfleischrohstoff für Fertigprodukt⁴⁾ Cotrimoxazol⁶⁾ Ampicillin⁸⁾ Rindfleisch Fertigprodukt¹⁰⁾ Rinderhackfleisch

Mit dem E-Test gelang es, die Ergebnisse der Agardiffusionsmethode zu bestätigen und somit die gleichen Stämme als resistent bzw. intermediär-empfindlich zu ermitteln. Demnach wurden auch mit dieser Empfindlichkeitsprüfung bei 14 aus Fäzes und bei 24 aus Lebensmitteln bovinen Ursprungs kultivierten VTEC-Stämmen Unempfindlichkeiten gegen einen oder mehrere antimikrobielle Wirkstoffe festgestellt.

Der statistische Vergleich der Resistenzhäufigkeiten zwischen verschiedenen Antibiotika (Test auf Symmetrie) fand mithilfe des Symmetrie-Tests nach McNemar (FLEISS, 1973) statt. Dabei wurde das Programm BiAS (ACKERMANN, 1998) eingesetzt. Auf diese Weise war zu ermitteln, dass sich die Unterschiede der Resistenzhäufigkeiten zwischen den Wirkstoffen Ampicillin und Amoxicillin/Clavulansäure ($p < 0,0001$), Ampicillin und Gentamicin ($p = 0,00015$), Ampicillin und Nalidixinsäure ($p < 0,0001$), Ampicillin und der Kombination Cotrimoxazol ($p = 0,0043$), Tetrazyklin und Amoxicillin/Clavulansäure ($p < 0,0001$), Tetrazyklin und Nalidixinsäure, Tetrazyklin und der Kombination Cotrimoxazol ($p < 0,0001$) sowie Tetrazyklin und Gentamicin ($p < 0,0001$) als signifikant bis hochsignifikant darstellen. Dahingegen erwiesen sich die Asymmetrien des Resistenzvorkommens zwischen den Antibiotika Ampicillin und Tetrazyklin, Amoxicillin/Clavulansäure und Nalidixinsäure, Amoxicillin/Clavulansäure und Gentamicin, Amoxicillin/Clavulansäure und Cotrimoxazol, Nalidixinsäure und Gentamicin, Nalidixinsäure und Cotrimoxazol sowie Cotrimoxazol und Gentamicin als nicht auffällig. Prozentangaben der in den einzelnen Jahren ermittelten „resistenten“ und „intermediär-empfindlichen“ VTEC-Stämme sind in den Abbildungen 9 und 10 illustriert.

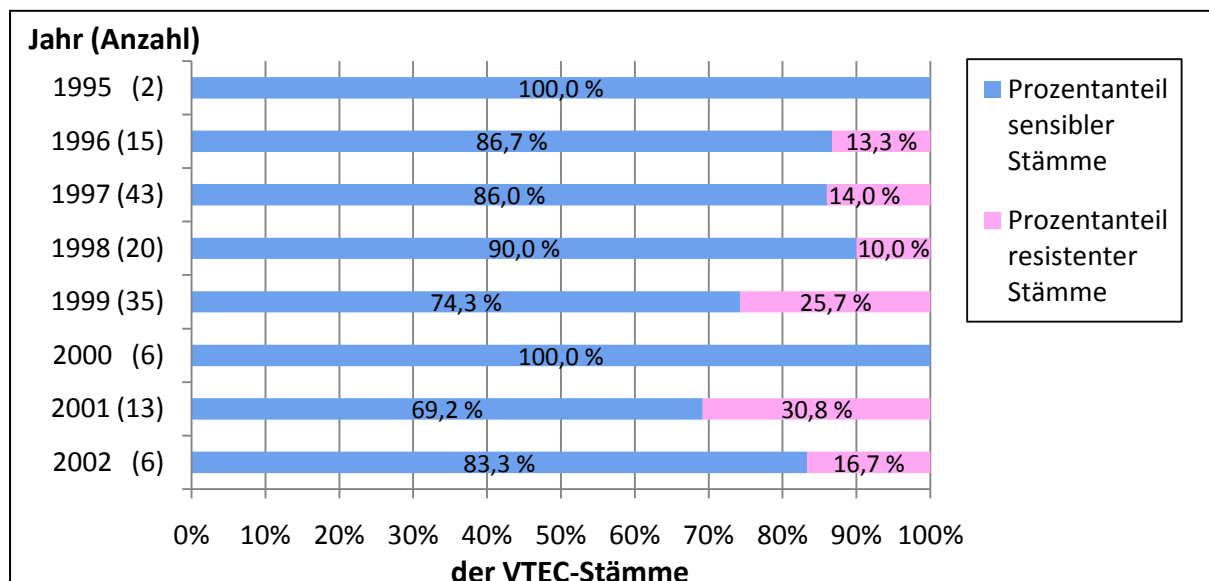


Abbildung 9: Anzahl und Prozentanteile sensibler und resistenter Stämme aus Lebensmitteln

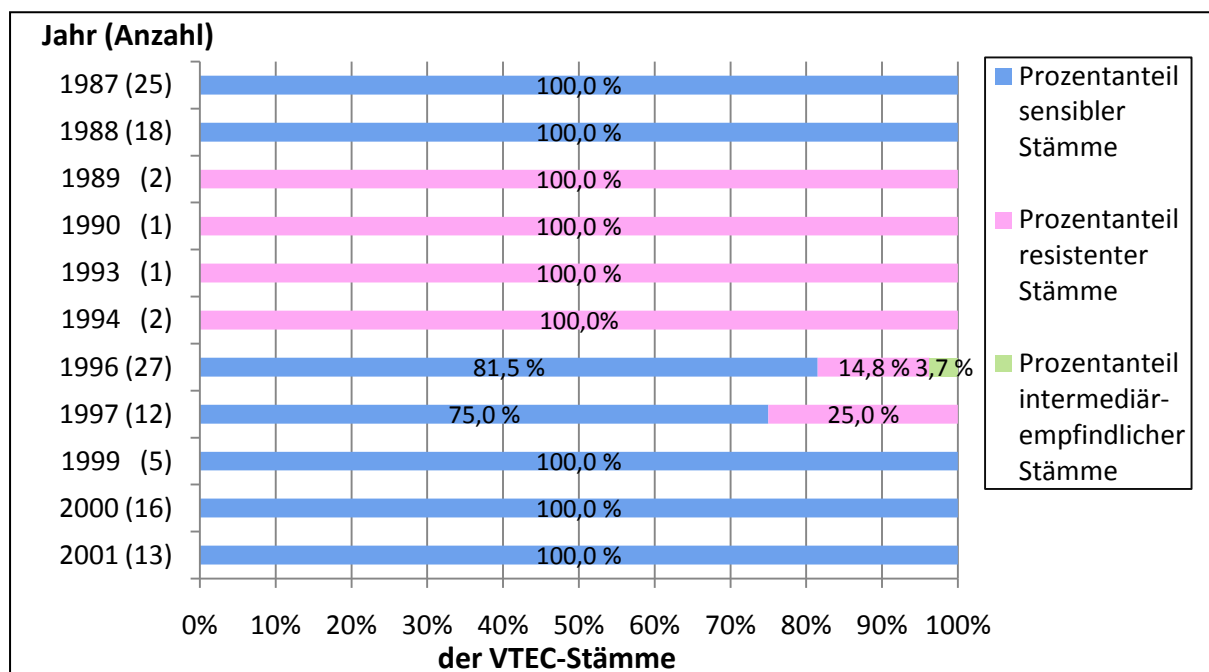


Abbildung 10: Anzahl und Prozentanteile sensibler, resistenter und intermediär-empfindlicher Stämme aus Kot

Bei den Angaben dieser Diagramme ist allerdings zu berücksichtigen, dass in einigen Jahren nur sehr wenige VTEC-Stämme getestet wurden. Demnach waren in diesen Jahren bei Feststellung von Resistenzen Prozentzahlen von bis zu 100 zu verzeichnen.

4.4 Vergleich der Resistenzen von VTEC-Stämmen aus Lebensmitteln und Kot

Die mithilfe der Agardiffusions- und E-Test-Methode ermittelten Ergebnisse zur Resistenzsituation von VTEC-Stämmen aus Lebensmitteln und Kot boviner Herkunft sollten einmal insgesamt und zudem für die einzelnen antimikrobiellen Wirkstoffe miteinander verglichen werden, wobei resistente und mäßig empfindliche Stämme summiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte standardmäßig mit dem Chi-Quadrat- (χ^2 -) Test (SACHS, 1997). Waren die Bedingungen zur Anwendung des χ^2 -Tests allerdings nicht gegeben, wurde der „Exakte Test von Fisher“ (FELDMAN und KLINGER, 1963; SACHS, 1997) verwendet. In beiden Fällen wurden die Testverfahren mit dem Programm BiAS (ACKERMANN, 1998) berechnet.

Bezogen auf die Unempfindlichkeit aller getesteten Antibiotika erwiesen sich die aus Lebensmittelproben isolierten VTEC zu 17,1 % und die aus Fäzes kultivierten Stämme zu 12,3 % (11,4 % resistent, 0,9 % intermediär-empfindlich) als nicht sensibel. Die statistische Auswertung unter Verwendung des χ^2 -Tests erbrachte beim Vergleich von Stämmen aus Lebensmitteln und Kot in Bezug auf alle getesteten Antibiotika keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Resistenzhäufigkeit.

Aus Tabelle 41 ist ersichtlich, dass Unempfindlichkeiten gegen Ampicillin bei den aus Fäzes kultivierten Stämmen geringfügig häufiger vertreten waren als bei denjenigen aus Lebensmitteln (8,8 % vs. 7,1 %); vergleichbare Ergebnisse zeigen die Unempfindlichkeiten gegenüber Tetrazyklin (10,5 % vs. 10,0 %). Die Unterschiede der Resistenzhäufigkeit waren bezüglich der Wirkstoffe Ampicillin und Tetrazyklin zwischen aus Lebensmittel- und Kotproben isolierten Stämmen statistisch jedoch nicht signifikant (χ^2 -Test). Dagegen stellten sich eine größere Anzahl der aus bovinen Lebensmitteln kultivierten VTEC als resistent gegenüber der Sulfamethoxazol/Trimethoprim-Kombination Cotrimoxazol heraus als Stämme aus Kot (2,9 % vs. 1,8 %), doch auch diese Unterschiede erwiesen sich statistisch als nicht auffällig („Exakter Test von Fisher“). Resistenzen gegen die verbleibenden drei antimikrobiellen Wirkstoffe Amoxicillin/Clavulansäure, Gentamicin und Nalidixinsäure ließen sich lediglich bei den aus Kot isolierten Stämmen verzeichnen, wobei es sich hier um mehrfach-resistente VTEC bzw. um gleichzeitig resistente und intermediär-empfindliche Stämme handelte. In diesem Zusammenhang ergab sich ausschließlich für den Wirkstoff

Gentamicin eine statistisch signifikant höhere Resistenzhäufigkeit bei den aus Kot isolierten Stämmen („Exakter Test von Fisher“).

Tabelle 41: Gegenüberstellung der bei VTEC-Stämmen aus Lebensmitteln (n = 140) sowie aus Kotproben (n = 114) bovinen Ursprungs ermittelten Resistenzen

Antimikrobieller Wirkstoff	Lebensmittel		Kot	
	Anzahl	Prozent (%)	Anzahl	Prozent (%)
Ampicillin	10	7,1	10	8,8
Amoxicillin/Clavulansäure	0	0	1	0,9
Gentamicin	0	0	4	3,5
Nalidixinsäure	0	0	2	1,8
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	4	2,9	2	1,8
Tetrazyklin	14	10,0	12	10,5

4.5 Abhängigkeit von Resistenzen und Virulenzfaktoren

Als weiterer Aspekt sollte der Zusammenhang zwischen den Resistenzhäufigkeiten (resistente und mäßig empfindliche Stämme) und den verschiedenen Virulenzfaktoren betrachtet werden. Dazu wurden in der Tabelle 42 die genannten Daten für die einbezogenen VTEC-Stämme zusammengestellt. Darüber hinaus ist eine Auflistung der Virulenzfaktoren der einzelnen VTEC-Stämme im Anhang (Tabelle 47 und 48) ersichtlich.

Tabelle 42: Zusammenhang zwischen Resistenzen und Virulenzgenen

Virulenzgene	<i>vtx1</i> ¹⁾ (%)	<i>vtx2</i> (%)	<i>vtx1</i> + <i>vtx2</i> (%)	nur <i>eae</i> -Gen (%)	Summe
Herkunft	Stämme aus Lebensmitteln				
Resistenz: ja	3 (30,0)	14 (23,0)	6 (14,0)	1 (3,8)	24
nein	7 (70,0)	47 (77,0)	37 (86,0)	25 (96,1)	116
Summe	10	61	43	26	140
Herkunft	Stämme aus Kot				
Resistenz: ja	10 (41,7)	2 (3,9)	2 (5,4)	0	14
nein	14 (58,3)	49 (96,1)	35 (94,6)	2	100
Summe	24	51	37	2	114
Summe Lebensmittel- und Kotstämme	34	112	80	28	254

¹⁾ Verotoxin-Gen

Die statistische Auswertung mit Hilfe des „Verallgemeinerten Exakten Tests von Fisher“ ergab, dass sich bei den aus Kot isolierten Stämmen das Vermögen zur Bildung von VT 1, VT 2 oder von VT 1 und VT 2 bzw. das alleinige Vorhandensein des *eae*-Gens signifikant unterschiedlich auf die Resistenzhäufigkeiten auswirkt ($p = 0,0001$). So treten die Resistenzen bei VTEC-Stämmen mit VT 1-Bildungsvermögen am häufigsten auf, gefolgt von Stämmen mit *vtx2*-Gen bzw. *vtx1*- und *vtx2*-Gen. Weiterhin sind Resistenzen bei Stämmen mit alleinigem Vorkommen des *eae*-Gens, ohne das Vorhandensein der für Verotoxine codierenden Gene, am niedrigsten. Im Gegensatz zu den aus Kot isolierten Stämmen war das Vorkommen der unterschiedlichen Varianten bei den VTEC aus Lebensmittelproben nicht auffällig.

Zusätzlich wurde überprüft, inwiefern das Vorkommen des *eae*-Gens mit dem Resistenzaufkommen der VTEC-Stämme in Bezug zu bringen ist. Eine Ausarbeitung dieser Werte ist in Tabelle 43 zusammengestellt.

Tabelle 43: Zusammenhang zwischen Resistenzen und dem Vorkommen des *eae*-Gens

Virulenzgen	<i>eae</i> -Gen (%)	kein <i>eae</i> -Gen (%)	Summe
Herkunft	Stämme aus Lebensmitteln		
Resistenz: ja	5 (9,6)	19 (21,6)	24
nein	47 (90,4)	69 (78,4)	116
Summe	52	88	140
Herkunft	Stämme aus Kot		
Resistenz: ja	13 (28,9)	1 (1,4)	14
nein	32 (71,1)	68 (98,6)	100
Summe	45	69	114
Summe Lebensmittel- und Kotstämme	97	157	254

Bei der Betrachtung des *eae*-Gen-Vorkommens und einer möglichen Korrelation mit den Resistenzhäufigkeiten fand der Chi²-Test (SACHS, 1997) Anwendung; zur Berechnung dieses Testverfahrens wurde das Programm BiAS (ACKERMANN, 1998) eingesetzt. Während sich für die aus Lebensmitteln isolierten Stämme abermals keine auffälligen Diskrepanzen der Resistenzhäufigkeiten ausmachen ließen, ergaben sich für die aus bovinen Fäzes kultivierten Stämme hinsichtlich der An- bzw. Abwesenheit des *eae*-Gens hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,0001$); bei *eae*-positiven Stämmen war eine deutlich höhere Resistenzhäufigkeit auffällig.

4.6 Homogenitätstest zu den betrachteten Zeiträumen

Für die aus Lebensmitteln und Kot isolierten bovinen VTEC-Stämme wurde eine Beurteilung der Homogenität des Resistenzvorkommens in bestimmten Beobachtungszeiträumen in Bezug auf alle Antibiotika und für die einzelnen Wirkstoffe vorgenommen. Es wurden Zeiträume zusammengefasst, da in den einzelnen Jahren teilweise zu wenige Stämme zur Testung herangezogen werden konnten. Eine Aufstellung des Resistenzvorkommens in den gewählten Beobachtungszeiträumen zur Beurteilung der Unempfindlichkeiten der getesteten Wirkstoffe insgesamt ist in Tabelle 44 veranschaulicht, während die einzelnen Antibiotika in Tabelle 45 betrachtet werden.

Tabelle 44: Betrachtung des Resistenzvorkommens gegen alle getesteten Antibiotika

Herkunft		Stämme aus Lebensmitteln					
Zeitraum		1995-1996	1997	1998	1999	2000-2002	Summe
Resistenz: (%)	ja	2 (11,8)	6 (14,0)	2 (10,0)	9 (25,7)	5 (20,0)	24 (17,1)
	nein	15 (88,2)	37 (86,1)	18 (90,0)	26 (74,3)	20 (80,0)	116 (82,9)
Summe		17	43	20	35	25	140
Herkunft		Stämme aus Kot					
Zeitraum		1987	1988- 1990	1993- 1996	1997- 1999	2000-2001	Summe
Resistenz: (%)	ja	0	3 (14,3)	8 (26,7)	3 (17,7)	0	14 (12,3)
	nein	25	18 (85,7)	22 (73,3)	14 (82,4)	21	100 (97,7)
Summe		25	21	30	17	21	114

Die Unterschiede der Resistenzhäufigkeiten in den Beobachtungszeiträumen, bezogen auf alle getesteten Antibiotika, erwiesen sich bei den Stämmen aus Lebensmitteln als nicht auffällig, d.h. es ließ sich eine relativ homogene Verteilung der Resistenzen verzeichnen. Dahingegen stellte sich die Inhomogenität bei den aus Kot isolierten Stämmen in den Beobachtungszeiträumen mit einer Wahrscheinlichkeit von $p = 0,0049$ als statistisch signifikant heraus („Verallgemeinerter Exakter Test von Fisher“, Eigenentwicklung der Biomathematik).

Tabelle 45: Betrachtung des Resistenzvorkommens gegenüber einzelnen Wirkstoffen**a) Ampicillin**

Herkunft		Stämme aus Lebensmitteln					
Zeitraum		1995-1996	1997	1998	1999	2000-2002	Summe
Resistenz: (%)	ja	0	1 (2,3)	1 (5,0)	6 (17,1)	2 (8,0)	10 (7,14)
	nein	17	42 (97,7)	19 (95,0)	29 (82,9)	23 (92,0)	130 (92,9)
Summe		17	43	20	35	25	140
Herkunft		Stämme aus Kot					
Zeitraum		1987	1988-1990	1993-1996	1997-1999	2000-2001	Summe
Resistenz: (%)	ja	0	1 (4,8)	7 (23,3)	2 (11,8)	0	10 (8,77)
	nein	25	20 (95,2)	23 (76,7)	15 (88,2)	21	104 (91,2)
Summe		25	21	30	17	21	114

b) Cotrimoxazol

Herkunft		Stämme aus Lebensmitteln					
Zeitraum		1995-1996	1997	1998	1999	2000-2002	Summe
Resistenz: (%)	ja	0	2 (4,7)	0	1 (2,9)	1 (4,0)	4 (2,9)
	nein	17	41 (95,4)	20	34 (97,1)	24 (96,0)	136 (97,1)
Summe		17	43	20	35	25	140
Herkunft		Stämme aus Kot					
Zeitraum		1987	1988-1990	1993-1996	1997-1999	2000-2001	Summe
Resistenz: (%)	ja	0	1 (4,8)	1 (3,3)	0	0	2 (1,7)
	nein	25	20 (95,2)	29 (96,7)	17	21	112 (98,2)
Summe		25	21	30	17	21	114

c) Tetrazyklin

Herkunft		Stämme aus Lebensmitteln					
Zeitraum		1995-1996	1997	1998	1999	2000-2002	Summe
Resistenz: (%)	ja	2 (11,8)	5 (11,6)	2 (10,0)	2 (5,7)	3 (12,0)	14 (10,0)
	nein	15 (88,2)	38 (88,4)	18 (90,0)	33 (94,3)	22 (88,0)	126 (90,0)
Summe		17	43	20	35	25	140
Herkunft		Stämme aus Kot					
Zeitraum		1987	1988-1990	1993-1996	1997-1999	2000-2001	Summe
Resistenz: (%)	ja	0	3 (14,3)	7 (23,3)	2 (11,8)	0	12 (10,5)
	nein	25	18 (85,7)	23 (76,7)	15 (88,2)	21	102 (89,5)
Summe		25	21	30	17	21	114

d) Gentamicin

Herkunft		Stämme aus Lebensmitteln					
Zeitraum		1995-1996	1997	1998	1999	2000-2002	Summe
Resistenz: ja		0	0	0	0	0	0
	(%) nein	17	43	20	35	25	140
Summe		17	43	20	35	25	140
Herkunft		Stämme aus Kot					
Zeitraum		1987	1988-1990	1993-1996	1997-1999	2000-2001	Summe
Resistenz: ja		0	2 (9,5)	2 (6,7)	0	0	4 (3,5)
	(%) nein	25	19 (90,5)	28 (93,3)	17	21	110 (96,5)
Summe		25	21	30	17	21	114

e) Nalidixinsäure

Herkunft		Stämme aus Lebensmitteln				
Zeitraum		1995-1996	1997	1998	1999	2000-2002
Resistenz:	ja	0	0	0	0	0
(%)	nein	17	43	20	35	25
Summe		17	43	20	35	25
Herkunft		Stämme aus Kot				
Zeitraum		1987	1988-1990	1993-1996	1997-1999	2000-2001
Resistenz:	ja	0	0	2 (6,7)	0	0
(%)	nein	25	21	28 (93,3)	17	21
Summe		25	21	30	17	21

f) Amoxicillin/Clavulansäure

Herkunft		Stämme aus Lebensmitteln				
Zeitraum		1995-1996	1997	1998	1999	2000-2002
Resistenz:	ja	0	0	0	0	0
(%)	nein	17	43	20	35	25
Summe		17	43	20	35	25
Herkunft		Stämme aus Kot				
Zeitraum		1987	1988-1990	1993-1996	1997-1999	2000-2001
Resistenz:	ja	0	0	1 (3,3)	0	0
(%)	nein	25	21	29 (96,7)	17	21
Summe		25	21	30	17	21

Die Betrachtung der einzelnen Antibiotika ergab bei den aus Kot isolierten Stämmen für die Wirkstoffe Ampicillin ($p = 0,0087$) und Tetrazyklin ($p = 0,013$) einen signifikanten Unterschied des Resistenzvorkommens zwischen den Beobachtungszeiträumen („Verallgemeinerter Exakter Test von Fisher“; Eigenentwicklung der Biomathematik). Für die anderen antimikrobiellen Wirkstoffe war eine solche Beobachtung nicht möglich, ebenso wie bei allen aus Lebensmitteln isolierten VTEC-Stämmen.

Demzufolge konnte lediglich für die Stämme aus Kot, sowohl bei der Gesamtbeurteilung aller antimikrobiellen Chemotherapeutika, als auch für die einzelnen Antibiotika Ampicillin und

Tetrazyklin eine signifikante Inhomogenität der Resistenzhäufigkeiten zwischen den Zeiträumen festgestellt werden.

4.7 Zeitliche Trends

Die mithilfe der durchgeführten Empfindlichkeitsprüfungen detektierten Resistenzhäufigkeiten sollten auf einen zeitlichen Trend, sowohl bezüglich aller getesteten Antibiotika, als auch für die einzelnen Wirkstoffe, betrachtet werden. Dies sollte der Feststellung dienen, inwiefern eine Resistenzzunahme oder -abnahme innerhalb der Isolationsjahre für die bovinen VTEC-Stämme aus Fäzes und Lebensmitteln zu verzeichnen ist. Dazu wurde die logistische Regression (DIXON, 1993) zur statistischen Auswertung herangezogen. Eine Zusammenstellung der Resistenzhäufigkeiten in den einzelnen Isolationsjahren ist in den Abbildungen 11 und 12 illustriert.

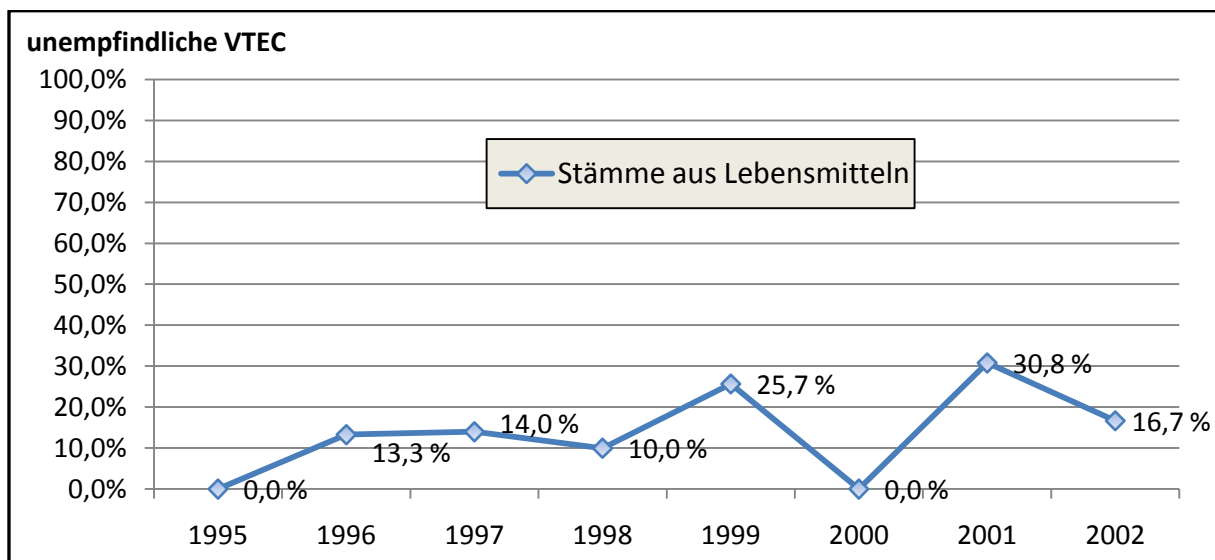


Abbildung 11: Resistenzhäufigkeiten der Stämme aus Lebensmitteln

Für die bovinen VTEC-Stämme aus Lebensmitteln war bei gemeinsamer Betrachtung aller getesteten Antibiotika und ebenso bei der Bewertung der einzelnen Wirkstoffe kein statistisch signifikanter zeitlicher Trend nachweisbar.

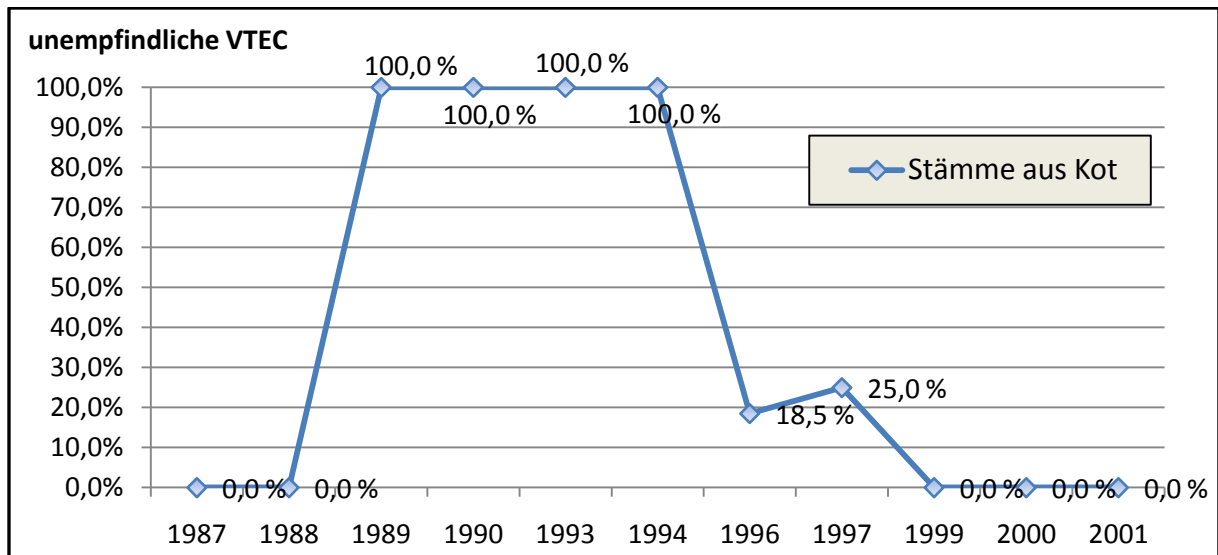


Abbildung 12: Resistenzhäufigkeiten der Stämme aus Kot

Gleichmaßen ließ sich bei der Bewertung der Stämme aus Kot bei Betrachtung aller Antibiotika und der einzelnen Substanzen für sich keine auffällige Zu- oder Abnahme von Resistenzen innerhalb der Isolationsjahre aufzeigen. Die in einigen Jahrgängen sehr hohen Unempfindlichkeiten von 100 % sind durch die niedrige Anzahl der getesteten VTEC-Stämme zu erklären.

5. Diskussion

5.1 Gründe für die Empfindlichkeitsprüfung bei VTEC

Es existiert ein Repertoire an resistenten Keimen bzw. Resistenzgenen, welche direkt oder indirekt (Kontakt zu Tieren, kontaminierte tierische und pflanzliche Lebensmittel, fäkal verunreinigte Abwässer und Badegewässer) auf den Menschen oder auf humanpathogene Erreger übertragbar sind (FEUERPFIL et al., 1999; FREY und LÖSCHER, 2002). Von besonderer Bedeutung ist hierbei der Transfer resistenter Zoonoseerreger wie beispielsweise VTEC auf den Menschen. Dennoch sind für den Menschen ursprünglich ungefährliche resistente Bakterien ebenfalls relevant, da diese im Darmtrakt des Menschen die Resistenzgene an die physiologische Darmflora oder auch an Krankheitserreger transferieren können, so dass das Risiko einer breiten Verteilung besteht (FLUCKEY et al., 2007; FLUGS, 2007).

Enterobacteriaceae sind in der Lage, Resistenzgene weiterzugeben (SCHMIDT et al., 1998), wodurch die Möglichkeit besteht, dass unempfindliche VTEC durch Übertragung ihrer Resistenzfaktoren an andere enterovirulente *E. coli*-Stämme und weitere Mikroorganismen ein Resistenz-Reservoir darstellen (GALLAND et al., 2001). Somit ist die Surveillance der antimikrobiellen Empfindlichkeit von VTEC zur Überwachung der Verbreitung resistenter pathogener Keime von Relevanz (SCHMIDT et al., 1998).

Durch die Entstehung und Verbreitung fehlender Empfindlichkeiten von VTEC-Stämmen werden negative klinische und epidemiologische Auswirkungen befürchtet (SCHMIDT et al., 1998; WHITE et al., 2002). Dementsprechend können in diesen pathogenen Erregern vorkommende antimikrobielle Resistenzen und Resistenzgene nicht nur zukünftige Antibiotikatherapien gefährden, sondern auch den Transfer von Resistenzgenen anregen (ZHAO et al., 2001). Im Einklang zu diesen Risiken wird auf die schwerwiegenden Nachteile einer VTEC-Infektion durch unempfindliche Stämme hingewiesen, da diese einen Selektionsvorteil beim Vorliegen antimikrobieller Wirkstoffe haben und damit die Wahrscheinlichkeit eines Ausbruchsgeschehens größer ist (BETTELHEIM et al., 2003). Desweiteren haben resistente VTEC im Gastrointestinaltrakt von Rindern und anderen Tieren gegenüber der physiologischen Darmflora bei Antibiotikaaanwendung einen Vorteil, so dass die Möglichkeit eines Anstiegs der Keimzahl in den Tieren (SCHMIDT et al., 1998; ZHAO et al., 2001; WHITE et al., 2002) sowie einer vermehrten fäkalen Ausscheidung dieser pathogenen Erreger besteht (ZHAO et al., 2001). Infolge dieser erhöhten VTEC-Prävalenz

wird eine gravierendere Kontamination von Lebensmitteln tierischen und besonders bovinen Ursprungs befürchtet (WHITE et al., 2002; ZHAO et al., 2001). Aufgrund dieser Aspekte ist die Bestimmung einer Antibiotikaresistenz-Entwicklung (obwohl antimikrobielle Substanzen nicht bei humanen EHEC-Infektionen eingesetzt werden sollten) bei der Produktion tierischer Lebensmittel nötig, da Infektionen des Menschen mit diesem pathogenen Erreger häufig durch ungenügend erhitztes Rindfleisch ausgelöst werden (GALLAND et al., 2001). Die Kenntnis der antimikrobiellen Resistenzen von VTEC-Stämmen ist darüber hinaus für die Einschätzung der Verbreitung in Lebensmitteln tierischer Herkunft von entscheidender Bedeutung (KLEIN und BÜLTE, 2003).

Da bei Rindern häufiger non-O157:H7-VTEC nachgewiesen werden als O157:H7-Stämme, wurde aufgrund des frequenteren Auffindens von Resistenzen in bovinen non-O157:H7-VTEC (als in von diesen Tieren stammenden O157:H7-Stämmen) zusätzlich gefolgert, dass die Resistenzphänotypen ihren Ursprung in Rindern haben könnten (SCHMIDT et al., 1998). Auch dieser Aspekt belegt, dass die Testung boviner VTEC-Stämme aufgrund des anerkannten Reservoirstatus der Rinder von besonderem Interesse ist.

Obwohl gesichert scheint, dass die Verabreichung von Antibiotika bei vorliegender möglicher VTEC-Infektion sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern vermieden werden sollte (WONG et al., 2000; ZIMMERHACKL, 2000; DUNDAS et al., 2001; TODD und DUNDAS, 2001), besteht die Ansicht, dass durch darmpathogene *E. coli* wie beispielsweise EHEC ausgelöste Magen-Darm-Infektionen im Ausnahmefall (junge Säuglinge, immundefiziente Patienten, Verdacht auf eine systemische Infektion) antibakteriell zu behandeln sind (SCHOLZ et al., 2002). Somit scheint festzustehen, dass trotz ausstehender finaler Definition zur Verwendung antimikrobieller Substanzen bei vorliegender EHEC-Infektion die Überwachung und Untersuchung resistenter Keime dieser Art von Bedeutung ist (WHITE et al., 2002). Dies gilt insbesondere auch deshalb, da resistente VTEC-Stämme humanen, bovinen und anderen Ursprungs regelmäßig nachzuweisen sind (FARINA et al., 1996) und deren Anzahl zudem, trotz größtenteils ausbleibender antimikrobieller Therapie, anzusteigen scheint (ref. in MORA et al., 2005). Ein solches Vorgehen ist notwendig, um ansteigende Resistenzprobleme zu überwachen, zukünftige Behandlungsstrategien für EHEC-Infektionen nicht zu gefährden und die öffentliche Gesundheit zu gewährleisten (MAIDHOF et al., 2002; SCHROEDER et al., 2002b; MORA et al., 2005).

5.2 Eigene Untersuchungen

Zentrale Ansatzpunkte für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren zum Einen die Frage nach einer eventuellen Zu- oder Abnahme antimikrobieller Resistenzen bei aus den Jahren 1987 bis 2002 aus Lebensmitteln und Fäzes isolierten bovinen VTEC-Stämmen sowie die Klärung eines möglichen signifikanten Unterschiedes der Resistenzhäufigkeiten zwischen den gewählten Beobachtungszeiträumen. Zum Anderen sollten die Resistenzprävalenzen zwischen den beiden einbezogenen Matrices Lebensmittel und Kot verglichen sowie ein denkbarer Zusammenhang zwischen den taxierten Resistenzhäufigkeiten und den vorhandenen Virulenzfaktoren erörtert werden.

In die Untersuchungen wurden Stämme bovinen Ursprungs einbezogen, da Rinder als Reservoir für VTEC gelten und somit eine besondere Bedeutung für die Übertragung resistenter Stämme auf den Menschen innehaben (EFSA, 2008). Die Verbreitung antimikrobieller Unempfindlichkeiten und von Resistenzgenen bei diesen Erregern kann in negativen klinischen und epidemiologischen Auswirkungen resultieren (SCHMIDT et al., 1998; WHITE et al., 2002); es könnten zukünftige Antibiotikatherapien gefährdet und zudem der Transfer von Resistenzgenen angeregt werden (ZHAO et al., 2001). Da *Enterobacteriaceae* in der Lage sind, Resistenzgene weiterzugeben (SCHMIDT et al., 1998), könnten unempfindliche VTEC durch Übertragung ihrer Resistenzfaktoren an andere enterovirulente *E. coli*-Stämme und weitere Mikroorganismen ein Resistenz-Reservoir darstellen (GALLAND et al., 2001). Im Gastrointestinaltrakt von Rindern besitzen resistente VTEC zudem bei Anwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen gegenüber der physiologischen Darmflora einen Vorteil, wodurch sich aufgrund des möglichen Anstiegs der Erregerkeimzahl neben einer vermehrten fäkalen Ausscheidung eine größere Kontamination von Lebensmitteln bovinen Ursprungs mit diesen Mikroorganismen ergeben kann (SCHMIDT et al., 1998; ZHAO et al., 2001; WHITE et al., 2002).

Als wichtigste Ursache für die Entstehung und Verbreitung von Resistenzen gilt die Verwendung von Antibiotika selbst (EFSA, 2008). Ein progressiver Einsatz dieser Pharmaka resultiert in einer Zunahme der Resistenzhäufigkeiten, da der Selektionsdruck auf die Erreger erhöht wird (KRESKEN et al., 1999). VTEC-Stämme haben mittlerweile gegen viele Antibiotikaklassen Unempfindlichkeiten entwickelt (ZHAO et al., 2001), und durch die ähnliche chemische Struktur sowie den gleichen Wirkmechanismus liegen zudem häufig auch

bereits gegen neuere Substanzen einer Wirkstoffklasse Resistenzen vor (WALLMANN, 1999). Inwieweit sich die Verwendung von Antibiotika in der Tierhaltung auf das Resistenzgeschehen humanpathogener Mikroorganismen auswirkt, wird kontrovers diskutiert (FREY und LÖSCHER, 2002), jedoch gehört ein Großteil dieser Wirkstoffe zu Antibiotikaklassen, die ebenso in der Humanmedizin Anwendung finden (EFSA, 2008). Der Einsatz bei Nutztieren beinhaltet die Gesichtspunkte der Prophylaxe, Metaphylaxe und der Therapie von Erkrankungen (SNARY et al., 2004). Die Anwendung bei Tieren findet aus strategischen Gründen meist über Futter oder Wasser bei einer großen Anzahl von Tieren statt. Dies hat zur Folge, dass Wirkstoffe teilweise in zu geringer Dosierung bzw. über einen zu langen Zeitraum gegeben werden (STROH, 2002) und fördert somit die Entstehung sowie die Selektion antimikrobieller Resistenzen (EFSA, 2008). Es herrscht allerdings die Meinung vor, dass die Resistenzprobleme in der Humanmedizin vorwiegend auf den übermäßigen Einsatz und die partiell falsche Anwendung der antimikrobiellen Chemotherapeutika bei der Behandlung humaner Infektionen zurückzuführen sind. So werden Antibiotika häufig vorzeitig und in nicht ausreichender Konzentration eingesetzt bzw. wird die Therapie mit diesen Substanzen oftmals frühzeitig beendet. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der ungezielte Wirkstoffeinsatz. Die genannten Faktoren erhöhen den Selektionsdruck auf die Bakterien und bewirken eine Resistenzselektion (WALLMANN, 1999; FREY und LÖSCHER, 2002; FLUGS, 2007). Ungeachtet dessen besteht die Zielsetzung auch im Bereich der Tierernährung und der Veterinärmedizin darin, Strategien zur Verminderung des Selektionsdrucks durch die Anwendung antimikrobieller Wirkstoffe und somit der Resistenzentwicklung zu bedenken (FREY und LÖSCHER, 2002). Teilweise wurde bereits dementsprechend gehandelt; seit Januar 2006 ist in Europa der Einsatz antibiotischer Wachstumsförderer in Futtermitteln nicht mehr erlaubt (FLUGS, 2007; EFSA, 2008). Diese wurden oftmals für vorkommende Resistenzen verantwortlich gemacht (WITTE et al., 1999; FLUGS, 2007). Das Ziel dieses Verbotes besteht in der Reduzierung der Anzahl resistenter Bakterien in Nutztieren, wobei die Auswirkungen auf das Vorkommen resistenter Keime bei Lebensmittel liefernden Tieren und in Bezug auf den Gesundheitszustand der Menschen bislang noch nicht bekannt sind (EFSA, 2008).

In den eigenen Untersuchungen wurden insgesamt 254 VTEC-Stämme bovinen Ursprungs mittels der Agardiffusionsmethode auf ihre Empfindlichkeit gegenüber 11 antimikrobiellen Wirkstoffen untersucht. Es wurden Substanzen ausgewählt, die in der Humanmedizin zum Einsatz kommen, da Resistenzen dieser Pathogruppe gegenüber humanmedizinisch angewendeten Antibiotika von besonderem Interesse sind.

Bei den einbezogenen Antibiotika handelt es sich um Substanzen wie Aminopenicilline (Ampicillin, Amoxicillin [Amoxicillin-Clavulansäure]) und die Sulfamethoxazol/Trimethoprim-Kombination Cotrimoxazol, die in der Humanmedizin bei durch EHEC ausgelösten Magen-Darm-Infektionen junger Säuglinge und immundefizienter Patienten sowie bei Verdacht auf eine systemische Infektion angewendet werden können (SCHOLZ et al., 2002). Ferner wurden Substanzen wie Fluorchinolone (Ciprofloxacin, Levofloxacin) und ebenso Cotrimoxazol mit überprüft, die häufig bei der Behandlung von durchfallkranken Kindern und Erwachsenen genutzt werden (ZHANG et al., 2000; ANDREOLI et al., 2002) und zusätzlich für zukünftige Behandlungen bei EHEC-bedingten Infektionen vorgesehene Wirkstoffe wie Carbapeneme (TAKAHASHI et al., 1997), Tetrazykline (ITO et al., 1997), Ampicillin und Fluorchinolone (KURIOKA et al., 1999; SAWAMURA et al., 1999; SHIOMI et al., 1999; YOSHIMURA et al., 1999). Desweiteren wurden antimikrobielle Wirkstoffe einbezogen, gegen welche VTEC-Stämme bereits bei früheren Studien teilweise (Ampicillin, Gentamicin, Nalidixinsäure, Tetrazykline) bzw. keine oder nur sehr selten (Cephalosporine der zweiten [Cefuroxim] und dritten [Cefotaxim] Generation) Resistenzen aufwiesen (FARINA et al., 1996; SCHMIDT et al., 1998; MORA et al., 2005; WALSH et al., 2006). Zusammenfassend wurden Substanzen berücksichtigt, gegen die bei *E. coli*-Stämmen häufig Resistenzen vorliegen, da sie bei Infektionen mit diesen Erregern Anwendung finden (Aminopenicilline, Cotrimoxazol, Fluorchinolone, Cephalosporine, Carbapeneme und Aminoglykoside) (KRESKEN, et al., 1999) und die gemäß Infektionsschutzgesetz bei *E. coli* getestet werden sollten (Meropenem, Ciprofloxacin, Cefotaxim) (WITTE et al., 2004).

An die Empfindlichkeitsprüfung mittels Agardiffusion schloss sich eine erneute Testung aller 38, dabei als „resistent“ und „mäßig empfindlich“ eingestuften Stämme gegenüber den sechs Antibiotika, gegen die Unempfindlichkeiten bei den verwendeten VTEC vorlagen, mithilfe der E-Test-Methode an. Die im Rahmen dieser Studie angewendeten Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung folgten den Vorgaben des Standards M31-A2 (Resistenztestung bei veterinärmedizinisch relevanten Bakterien) des Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), vormals bekannt als National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). Es wurde die Methode der Routineempfindlichkeitsprüfung des CLSI-Dokuments M31-A2 gewählt, da der Agardiffusionstest in Kliniken und Instituten größtenteils auf diese standardisierte Weise durchgeführt wird. Die Auswertung der Ergebnisse fand gemäß den im CLSI-Dokument M31-A2 (NCCLS, 2002) sowie den Supplementen M31-S1 (NCCLS, 2004) und M100-S17 (NCCLS, 2007) angegebenen Grenzwerten statt, wodurch eine Einteilung der

Stämme in die Kategorien „sensibel“, „intermediär-empfindlich“ und „resistent“ erfolgen konnte. Die zur Qualitätssicherung der Empfindlichkeitsprüfungen empfohlenen Referenzstämme wurden bei den Versuchsdurchgängen mit getestet, und die durchgeführten Untersuchungen wurden nur dann gewertet, wenn die Ergebnisse der Referenzstämme mit den für sie vorgegebenen Grenzwerten übereinstimmten.

5.2.1 Einstellung des Inokulums

Für die Beimpfung der Müller-Hinton-Agar-Platten zur Durchführung der Empfindlichkeitsprüfungen wird gemäß dem CLSI-Standard M31-A2 (NCCLS, 2002) ein Inokulum mit einem Trübungsstandard nach McFarland von 0,5 empfohlen, was einer Bakteriensuspension von 1 bis 2×10^8 KbE/ml entspricht. Bei Verwendung eines Spektralphotometers (Lichtweg 1 cm) ist für diese Bakteriendichte bzw. diesen Trübungsstandard eine Absorption zwischen 0,08 und 0,10 bei 625 nm angegeben (NCCLS, 2002; MURRAY et al., 2003).

Um mit einem solchen standardisierten Inokulum die Untersuchungen durchführen zu können, wurde in Vorversuchen die vorgegebene Bakteriendichte mithilfe der photometrischen Bestimmung und mittels des Tropfplattenverfahrens festgestellt. Diese Versuche wurden im Doppelansatz mit jeweils drei VTEC-Stämmen pro eingestellter optischer Dichte (0,08; 0,1; 0,15 und 0,2) vollzogen, und je Stamm wurde der Vorgang dreimal wiederholt. So ergab sich aus insgesamt neun (drei Stämme, dreimalige Durchführung pro Stamm) Werten ein Durchschnittswert der vorliegenden Bakterien-suspension pro Absorption, wodurch nachfolgend die Absorption mit der am ehesten der Vorgabe von 1 bis 2×10^8 KbE/ml entsprechenden Keimdichte ausgewählt werden konnte. Ebenso wurde auch mit den Referenzstämmen verfahren, wobei die Versuche hier für jeden Referenzstamm dreimal pro angegebene Absorption durchgeführt wurden. Die detaillierte Vorgehensweise der Durchführung und der Auswertung sind Kapitel 3.2.1 zu entnehmen.

Aufgrund der mit diesen Vorversuchen durch Errechnung von Mittelwerten erzielten Ergebnissen, die aufgeschlüsselt in Kapitel 4.1 dargestellt sind, wurden alle VTEC-Stämme und alle mitgeführten Referenzstämme auf eine Absorption von 0,1 bei 625 nm mittels Spektralphotometer eingestellt. Auch die Ergebnisse der zur Überprüfung des vorgegebenen konfluenten Wachstums der mittels sterilen Wattetupfern mit Inokulum beimpften Platten

bestätigten, dass die Einstellung auf eine Absorption von 0,1 bei 625 nm mit den Vorgaben (NCCLS, 2002) in Einklang zu bringen war. Mit auf diese Weise eingestellter Keimsuspension wurden daraufhin alle Müller-Hinton-Agar-Platten (bei *Streptococcus pneumoniae* ATCC®49619 Verwendung von Müller-Hinton-Agar-Platten mit Blut) mittels sterilem Tupfer für die Durchführung der Empfindlichkeitsprüfungen beimpft, und alle Platten wiesen nach der Inkubation das vorgegebene konfluente Wachstum auf.

5.2.2 Empfindlichkeitsprüfungen

Viele VTEC-Stämme diversen Ursprungs erweisen sich gegenüber in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika als resistent (KRISHNAN et al., 1987; FARINA et al., 1996), was die Notwendigkeit des Resistenzmonitorings bei diesem pathogenen Erreger unterstreicht (FARINA et al., 1996).

In den eigenen Untersuchungen wurden zunächst alle 254 VTEC-Stämme der Tierart Rind mittels der Agardiffusions-Methode unter Verwendung von kommerziell erworbenen, antimikrobiell vorbeschickten Testplättchen auf ihre Empfindlichkeit untersucht. Dabei erwiesen sich 24 (17,1 %) der 140 aus Lebensmitteln sowie 14 (12,3 %) der 114 aus Kot kultivierten Stämme bovinen Ursprungs als resistent bzw. mäßig empfindlich gegenüber sechs der 11 getesteten Wirkstoffe. Bei einem der 14 aus Fäzes isolierten unempfindlichen VTEC-Stämme war eine intermediäre Empfindlichkeit gegen Tetrazyklin nachweisbar, und ein Stamm aus Kot zeigte neben seiner Resistenz gegen Amoxicillin/Clavulansäure zusätzlich eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin.

Die Angaben der Resistenzhäufigkeit bei aus Lebensmitteln und Fäzes bovinen Ursprungs isolierten VTEC-Stämmen differieren in der Literatur, liegen aber zumindest teilweise deutlich höher als die in den eigenen Untersuchungen ermittelten Resistenzen. Während sich in Deutschland bei der Untersuchung von 36 aus Mastbullen und 28 aus Milchrindern kultivierten Stämmen keine Unempfindlichkeiten gegen die untersuchten Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin, Gentamicin, Tetrazyklin, Chloramphenicol und Sulfadimidin/Trimethoprim) feststellen ließen (BÜLTE et al., 1990), konnten auch BETTELHEIM et al. (2003) bei der Testung von 83 in Australien aus Lebensmitteln und Kot isolierten VTEC-Stämmen lediglich 6,0 % resistente VTEC ausmachen, wobei diese alle von gastrointestinal kranken

Tieren stammten. Resistenzen ließen sich bei den Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe gegen die Wirkstoffe Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin, Sulfathiazol, Tetrazyklin und Trimethoprim ermitteln. Im Gegensatz dazu fanden MORA et al. (2005) in Spanien bei 40,3 % der Stämme von gesunden Rindern und bei 55,4 % der VTEC aus Rinderhackfleisch Resistenzen vor. Bei dieser Studie ist die Vielzahl der überprüften antimikrobiellen Wirkstoffe hervorzuheben. So lagen bei den VTEC von gesunden Rindern gegen eine Vielzahl der getesteten Substanzen (Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Piperacillin, Aztreonam, Cefalotin, Cefazolin, Cefuroxim, Cefotaxim, Cefoxitin, Streptomycin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Tobramycin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Nitrofurantoin, Nalidixinsäure, Sulfisoxazol, Trimethoprim und Cotrimoxazol) Resistenzen vor, wohingegen nur bei der Überprüfung gegen fünf der Wirkstoffe (Imipenem, Ceftriaxone, Ceftazidime, Amikacin, Ciprofloxacin) keine Unempfindlichkeiten festzustellen waren. Die aus Rinderhackfleisch isolierten Stämme zeigten gegen die gleichen Antibiotika Resistenzen, lediglich gegen die Wirkstoffe Aztreonam und Cefotaxim waren sie im Gegensatz zu den VTEC aus gesunden Rindern empfindlich. Sowohl bei den Stämmen aus Rinderhackfleisch als auch bei den VTEC aus gesunden Rindern waren am häufigsten Resistenzen gegen Sulfisoxazol, Tetrazyklin und Streptomycin aufzufinden.

Auch der Arbeitsgruppe von FARINA et al. (1996) war es möglich, in Italien bei 57,1 % der Stämme bovinen Ursprungs Unempfindlichkeiten nachzuweisen. Diese untersuchten VTEC erwiesen sich als resistent gegenüber den Wirkstoffen Ampicillin, Chloramphenicol, Gentamicin, Streptomycin, Sulfisoxazol, Tetrazyklin und Sulfamethoxazol/Trimethoprim, jedoch als sensibel gegen Ceftazidim, Ceftriaxon, Cefalotin und Ciprofloxacin. Die teilweise beachtlichen Resistenzprävalenzen dieser pathogenen Erreger werden als Anlass zur Besorgnis gesehen (MORA et al., 2005). GIAMMANCO et al. (2002) zeigten ebenso bei 60,0 % der aus Kälbern isolierten Stämme in Italien Resistenzen (Amoxicillin, Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin, Sulfonamide, Tetrazyklin und Trimethoprim; sensibel gegen: Amdinocillin, Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Imipenem und Nalidixinsäure) auf, wohingegen sich alle aus Kälbern in Frankreich kultivierten VTEC gegenüber den aufgeführten Antibiotika als sensibel erwiesen. KLEIN und BÜLTE (2003) detektierten darüber hinaus Resistenzen von 93,3 % bei Stämmen aus Rinderhackfleisch (Ampicillin/Sulbactam, Cefalotin, Chloramphenicol, Tetrazyklin; sensibel gegen: Ampicillin, Cefazolin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Lomefloxacin, Nitrofurantoin, Norfloxacin, Ofloxacin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol) und von 60,0 % bei VTEC aus Rinderkot, wobei sich bei Stämmen aus dieser Matrix lediglich Unempfindlichkeiten gegen den Wirkstoff Cefalotin

feststellen ließen. WALSH et al. (2006) machten in Irland unter den Stämmen von Rindern (klinische Proben) 33,3 % als resistent ausfindig (Ampicillin, Kanamycin, Minocyclin, Streptomycin, Sulfonamide, Tetrazyklin), bei den Stämmen aus Rinderfell dagegen lediglich 6,4 % (Ampicillin, Cefachlor, Kanamycin, Minocyclin, Moxalactam, Nalidixinsäure, Norfloxacin, Streptomycin, Sulfonamide, Tetrazyklin) und bei den VTEC-Stämmen aus Rinderhackfleisch wiederum 37,8 % (Ampicillin, Cefachlor, Chloramphenicol, Doxycyclin, Kanamycin, Monocyclin, Nalidixinsäure, Streptomycin, Sulfonamide, Tetrazyklin, Trimethoprim). Keiner der Stämme zeigte eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Cefixim und Ciprofloxacin, und hervorzuheben ist zudem, dass die VTEC-Stämme aus Rinderhackfleisch am häufigsten Resistenzen gegen Nalidixinsäure und Streptomycin aufzeigten.

Diese Werte belegen zum Einen, dass antimikrobiell resistente bovine VTEC-Stämme in vielen Ländern weit verbreitet sind und zum Anderen auch die teilweise sehr unterschiedlichen Resistenzhäufigkeiten der verschiedenen Studien, wobei in fast allen Studien Resistenzen gegen die Wirkstoffe Streptomycin und Ampicillin sowie gegen die Wirkstoffklassen Tetrazykline und Sulfonamide auffällig sind. Zudem unterstreichen sie die Notwendigkeit einer Überwachung der Antibiotikaresistenz-Entwicklung bei Erregern aus Lebensmitteln tierischen Ursprungs, insbesondere von VTEC, da viele humane EHEC-Infektionen durch ungenügend erhitztes Rindfleisch ausgelöst werden (GALLAND et al., 2001). Desweiteren ist es von großer Bedeutsamkeit, die Verbreitung vorkommender Resistenzen in solchen Lebensmitteln einschätzen zu können (KLEIN und BÜLTE, 2003).

Fäkal kontaminierte Rohmilch und Rohmilchprodukte sind wie andere Lebensmittel boviner Herkunft als Ursprung für VTEC und somit als Gefahr für die öffentliche Gesundheit bekannt (STEPHAN und KÜHN, 1999; MURPHY et al., 2007). Ebenso kann eine sekretorische Kontamination von Rohmilch mit VTEC während einer Mastitis-Erkrankung nicht ausgeschlossen werden (STEPHAN und KÜHN, 1999). Mit der Untersuchung von Milchfiltern lassen sich ganze Milchrind- sowie auch caprine und ovine Herden auf den pathogenen Erreger überprüfen (MURPHY et al., 2005), und augenscheinlich sind auch in solchen Stämmen antimikrobielle Resistenzen nachweisbar. So erwiesen sich bei zwei Untersuchungen in Irland einmal 6,3 % (einer von 16 Stämmen; Streptomycin) und ein anderes mal 40,0 % (zwei von fünf Stämmen; 1. Stamm: Streptomycin, 2. Stamm Ampicillin, Cefalotin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Amoxicillin/Clavulansäure, Streptomycin, Tetrazyklin) der aus Milchfiltern isolierten VTEC-Stämme als resistent (MURPHY et al., 2005;

MURPHY et al., 2007). In den eigenen Untersuchungen wurden bei den 12 aus Rohmilch bzw. Rohmilchprodukten kultivierten VTEC-Stämmen keine Unempfindlichkeiten festgestellt. Positive VTEC-Ergebnisse in Rohmilch und Rohmilchprodukten sowie Milchfiltern sind als Index für die Ausscheidung der Tiere und ebenso der Kontamination während des Melkvorgangs einzuschätzen. Zudem sind sie als Gefahr für die Übertragung auf den Menschen zu bewerten (MURPHY et al., 2007).

Wirkstoffe, gegen die sich in dieser Studie Unempfindlichkeiten verzeichnen ließen, waren Ampicillin (7,9 %) und die Kombination Amoxicillin/Clavulansäure (0,4 %), ebenso Gentamicin (1,6 %), die Sulfamethoxazol/Trimethoprim-Kombination Cotrimoxazol (2,4 %), Nalidixinsäure (0,8 %) sowie Tetrazyklin (10,2 %).

Im Einklang mit den eigenen Erhebungen stehen die häufig in der Literatur beschriebenen relativ hohen (teilweise auch sehr hohen) Resistenzhäufigkeiten gegen die Wirkstoffe Ampicillin und insbesondere gegen Tetrazyklin bei VTEC-Stämmen sowohl bovinen aber auch anderen Ursprungs (FARINA et al., 1996; ZHAO et al., 2001; KHAN et al., 2002; MORA et al., 2005; VON MÜFFLING et al., 2007). So wiesen FARINA et al. (1996) bei humanen bzw. bovinen VTEC-Stämmen Resistenzen von 57,1 % bzw. 31,8 % gegenüber Tetrazyklin und Unempfindlichkeiten von 57,1 % bzw. 22,7 % gegen Ampicillin nach. Ebenso ermittelten MORA et al. (2005) bei VTEC bovinen Ursprungs Resistenzen gegenüber Ampicillin bzw. Tetrazyklin von 7,4 % bzw. 32,3 %, bei Stämmen ovinen Ursprungs von 0 % bzw. 20 % und bei von Menschen isolierten VTEC-Stämmen von 18,8 % bzw. 31,9 %. Auch VON MÜFFLING et al. (2007) stellten bei Stämmen bovinen Ursprungs Resistenzen gegen Ampicillin bzw. Tetrazyklinen (Chlortetrazyklin, Oxytetrazyklin) von 10,3 % bzw. 6,9 % und bei von Schweinen kultivierten Stämmen von 12,5 % bzw. 78,3 % fest. Anzumerken ist, dass solche Resistenzhäufigkeiten nach wie vor nachzuweisen sind, und zwar trotz der Tatsache, dass β -Lactam-Antibiotika und Tetrazykline seit 1975 nicht mehr als Leistungsförderer in Europa eingesetzt werden (SCHWARZ und CHASLUS-DANCLA, 2001).

Die für Cotrimoxazol angegebenen Resistenzen liegen meist höher als die in den eigenen Untersuchungen erzielten Ergebnisse. In der Literatur ist von Unempfindlichkeiten zwischen ca. 6 % und 23 % bei bovinen VTEC-Stämmen aus Kot- und Lebensmittelproben berichtet worden (FARINA et al., 1996; MORA et al., 2005; VON MÜFFLING et al., 2007), wohingegen andere Autoren keine bzw. lediglich minimale Resistenzen gegen diese Wirkstoffkombination detektierten (KLEIN und BÜLTE, 2003; WALSH et al., 2006). Die in dieser Studie ermittelten sehr geringen Unempfindlichkeiten gegen Nalidixinsäure werden auch in anderen Arbeiten

beschrieben; so finden sich Resistenzprävalenzen von 0 % bis etwa 6 % (KHAN et al., 2002; MORA et al., 2005; WALSH et al., 2006). Analog hierzu verhält es sich mit den Werten von Amoxicillin/Clavulansäure (ZHAO et al., 2001; MORA et al., 2005). So ermittelten MORA et al. (2005) Resistenzen von 1,4 % bei humanen VTEC-Stämmen, 1,6 % bei Stämmen bovinen Ursprungs und 0 % bei von Schafen isolierten Stämmen.

Unempfindlichkeiten von VTEC-Stämmen differenten Ursprungs gegenüber Gentamicin liegen gemäß Literaturangaben häufig bei 0 % (ZHAO et al., 2001; KLEIN und BÜLTE, 2003; VON MÜFFLING et al., 2007), teilweise aber auch etwas höher (STEPHAN und SCHUMACHER, 2001), was gleichermaßen für die eigenen Untersuchungen zutrifft, während FARINA et al. (1996) Werte von 9,1 % für Stämme humanen Ursprungs und von 28,6 % für von Rindern isolierte VTEC nachwiesen. Die in den eigenen Untersuchungen festgestellte Sensibilität aller VTEC-Stämme gegen Fluorchinolone wurde ebenso in anderen Arbeiten beschrieben (FARINA et al., 1996; SCHMIDT et al., 1998; ZHAO et al., 2001; KLEIN und BÜLTE, 2003; MORA et al., 2005), teilweise konnten aber auch sehr geringe Resistenzen von 0,4 % bei Stämmen bovinen Ursprungs ermittelt werden (WALSH et al., 2006). Gleichfalls wurde die für Carbapeneme aufgezeigte Empfindlichkeit aller Stämme ebenso von anderen Autoren festgestellt (SCHMIDT et al., 1998), wohingegen MORA et al. (2005) bei humanen VTEC-Stämmen zumindest eine Resistenz von 0,7 % nachwiesen. Auch für Cephalosporine finden sich Übereinstimmungen der eigenen Ergebnisse mit den Erhebungen anderer Arbeitsgruppen; so belegten auch diese nur sehr geringe bis keine Resistenzen (FARINA et al., 1996; MORA et al., 2005). Entgegen diesen Resultaten verzeichneten KLEIN und BÜLTE (2003) unter den unempfindlichen Stämmen jedoch häufig Resistenzen gegen Cefalotin. So stellte diese Arbeitsgruppe bei 73,3 % der aus bovinem Hackfleisch isolierten VTEC, bei 60,0 % der Stämme aus Rinderkot, bei 100 % der aus Lammfleisch kultivierten Stämme und bei 90 % der VTEC aus Schafkot Unempfindlichkeiten gegenüber diesem Cephalosporin der ersten Generation fest.

Entsprechend der genannten Erhebungen ist vom Einsatz der Wirkstoffe Ampicillin und Tetrazyklin bei vorliegender humaner EHEC-Infektion abzuraten und demgegenüber auf die Vorteile der Anwendung von Fluorchinolonen, Carbapenemen und neueren Cephalosporinen, aufgrund der größtenteils vorhandenen Sensibilität bei VTEC-Stämmen, hinzuweisen.

Die bei humanen VTEC-Stämmen unterschiedlicher Länder nachgewiesenen Resistenzen gegenüber Penicillinen, Tetrazyklinen und der Sulfamethoxazol/Trimethoprim-Kombination Cotrimoxazol liegen wie auch für Stämme bovinen Ursprungs verhältnismäßig hoch. Darüber

hinaus sind aber auch partiell hohe Unempfindlichkeiten gegen Aminoglykoside und Sulfonamide ermittelbar (FARINA et al., 1996; SCHMIDT et al., 1998; MORA et al., 2005); wiederum lassen sich gegen Cephalosporine, Fluorchinolone und Carbapeneme wenige bis keine Resistenzen bestimmen (SCHMIDT et al., 1998). Insgesamt sind die bei VTEC-Stämmen humanen Ursprungs detektierten Resistenzzahlen sehr unterschiedlich (zwischen ca. 6 % und 39 %) (SCHMIDT et al., 1998; BETTELHEIM et al., 2003; MORA et al., 2005; WALSH et al., 2006). Bei einem Vergleich der Resistenzhäufigkeiten von humanen und bovinen Stämmen bestimmten SCHROEDER et al. (2002a) und BETTELHEIM et al. (2003) höhere Auffälligkeiten bei von Menschen isolierten Stämmen, wohingegen durch die Untersuchungen von FARINA et al. (1996), MORA et al. (2005) und WALSH et al. (2006) gegensätzliche Ergebnisse aufgezeigt wurden. So ermittelten FARINA et al. (1996) bei 57,1 % der humanen VTEC-Stämme und bei 50,0 % der Stämme bovinen Ursprungs Resistenzen und MORA et al. (2005) bei 42 % der vom Rind isolierten (Rinderhackfleisch inbegriffen) und bei 39,1 % der von Menschen kultivierten VTEC. Die Untersuchungen von WALSH et al. (2006) ergaben ebenso bei allen von Rindermatrices isolierten VTEC Unempfindlichkeiten von 14,6 % im Gegensatz zu 9,5 % bei Stämmen von Menschen. Aufgrund dieser Erhebungen scheint es nicht möglich, eine allgemeingültige Aussage zu treffen, inwieweit bei VTEC-Stämmen bovinen oder humanen Ursprungs häufiger Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe im Allgemeinen vorliegen.

Bei VTEC-Stämmen porciner Herkunft lassen sich im Vergleich zu bovinen Stämmen häufiger Resistenzen detektieren (BETTELHEIM et al., 2003; VON MÜFFLING et al., 2007), was durch die häufigere Anwendung von Antibiotika bei Schweinen begründet sein kann (VON MÜFFLING et al., 2007). So wiesen BETTELHEIM et al. (2003) in Australien bei 71 % (22/31) der von Schweinen isolierten VTEC Resistenzen nach, wobei 14 dieser Stämme gegen mindestens zwei Antibiotika resistent waren und am häufigsten Unempfindlichkeiten gegen Tetrazyklin, Streptomycin und Sulfathiazol aufgezeigt wurden; eine Situation, die auch bei humanen und bovinen VTEC-Stämmen auffällig war. Im Gegensatz dazu lagen die Resistenzen bei Stämmen von Rindern lediglich bei 6,0 %. Die von VON MÜFFLING et al. (2007) untersuchten VTEC-Stämme porcinen Ursprungs erwiesen sich, abgesehen von der Sulfonamid-Resistenz (100 %), zu 56 % als resistent, wobei am häufigsten Resistenzen gegen Tetrazykline auffindbar waren und über die Hälfte der VTEC Mehrfachresistenzen aufwiesen. Bei den von Rindern kultivierten Stämmen ließen sich dagegen lediglich 11,8 % als resistent ermitteln (abgesehen von der Sulfonamid-Resistenz von 100 %), und dabei zeigten sich am häufigsten Resistenzen gegen die Kombination Sulfamethoxazol/Trimethoprim. Die

Überprüfung von VTEC-Stämmen der Tierarten Schaf und Ziege weist in den meisten Fällen niedrige bzw. keine Resistenzhäufigkeiten auf (BETTELHEIM et al., 2003; MURPHY et al., 2007). KLEIN und BÜLTE (2003) ermittelten jedoch bei neun von 10 aus Schafkot isolierten Stämmen und bei allen aus Lammfleisch kultivierten VTEC (fünf) Resistenzen, wobei allen resistenten bzw. mäßig empfindlichen VTEC Unempfindlichkeiten gegen Cefalotin gemein waren.

Es bleibt somit festzuhalten, dass die vielfach bewiesene Verbreitung und der teilweise postulierte Anstieg von Resistenzen und Multiresistenzen bei von Tieren isolierten VTEC-Stämmen sowie die leichte Übertragungsmöglichkeit resistenter Bakterien auf den Menschen über Lebensmittel liefernde Tiere die Notwendigkeit des reduzierten Einsatzes antimikrobieller Chemotherapeutika in der Tierproduktion beweist (VON MÜFFLING et al., 2007). Diese Forderung wird durch den Aspekt unterstützt, dass Lebensmittel liefernde Tiere und auch Lebensmittel tierischen Ursprungs heutzutage weltweit gehandelt werden, und die Probleme auftretender Resistenzen somit nicht nur für ein einzelnes Land sondern Länder übergreifend bestehen (AARESTRUP, 2004).

Gemäß Literaturangaben sind relativ häufig multiresistente Stämme nachweisbar. Am häufigsten ist demnach die Kombination Tetrazyklin, Streptomycin und Sulfonamide vertreten (FARINA et al., 1996; STEPHAN und SCHUMACHER, 2001; GIAMMANCO et al., 2002; MORA et al., 2005). Auch in den eigenen Untersuchungen konnten 34,2 % (13 von 38 unempfindlichen VTEC) mehrfach resistente bovine VTEC-Stämme gefunden werden. Dabei wiesen neun Stämme (23,7 %) eine Zweifach-Resistenz (davon 6 x gegen Ampicillin und Tetrazyklin, 2 x gegen Cotrimoxazol und Trimethoprim, 1 x gegen Gentamicin und Tetrazyklin) und eines (2,6 %) eine Dreifach-Resistenz (Ampicillin, Cotrimoxazol, Tetrazyklin) auf. Darüber hinaus stellten sich drei (7,9 %) Stämme gegen vier der getesteten Antibiotika (1 x gegen Ampicillin, Cotrimoxazol, Gentamicin und Tetrazyklin, 2 x gegen Ampicillin, Gentamicin, Nalidixinsäure und Tetrazyklin) als unempfindlich dar. VON MÜFFLING et al. (2007) ermittelten desweiteren bei über 50 % der von Schweinen und 25 % der von Rindern isolierten unempfindlichen VTEC in Deutschland mehrfach (mindestens dreifach) resistente Stämme. Diese bei VTEC-Stämmen häufig nachgewiesenen Multiresistenzen werden zumindest teilweise auf die Übertragung mobiler genetischer Elemente (Plasmide, Transposons und Integrons) zurückgeführt, da mit diesen mehrere Resistenzgene gleichzeitig transferierbar sind (MORA et al., 2005).

Die mithilfe der Agardiffusionsmethode als „resistent“ und „mäßig empfindlich“ ermittelten VTEC-Stämme wurden nachfolgend mit der E-Test-Methode unter Verwendung von kommerziell erworbenen, antimikrobiell vorbeschickten Kunststoff-Teststreifen erneut getestet. Auf diese Weise sollte der MHK-Wert zur Erzielung eines quantitativen Ergebnisses ermittelt werden. Gleichzeitig sollte mit Anwendung des E-Tests überprüft werden, ob mit dieser zweiten Methode die gleichen Stämme als nicht empfindlich detektiert werden konnten. Es stellte sich heraus, dass die identischen resistenten und mäßig empfindlichen VTEC-Stämme nachweisbar waren ebenso wie mit der Agardiffusionsmethode. Somit wurden auch mit dieser Empfindlichkeitsprüfung bei 14 aus Kot und bei 24 aus Lebensmitteln bovinen Ursprungs kultivierten VTEC-Stämmen Unempfindlichkeiten gegen einen oder mehrere antimikrobielle Wirkstoff(e) nachgewiesen. Eine prinzipiell analoge Vorgehensweise war auch bei SCHMIDT et al. (1998) bei der Testung humaner VTEC-Stämme zu verzeichnen. So führte auch diese Arbeitsgruppe zuerst ein Screening aller Stämme auf antimikrobielle Resistenzen mit dem Agardiffusionstest durch und untersuchte danach noch einmal alle unempfindlichen VTEC mit der E-Test-Methode.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass das Vorkommen resistenter VTEC-Stämme bovinen, aber auch anderen Ursprungs, die Notwendigkeit des Resistenzmonitorings bei diesen darmpathogenen Bakterien unterstreicht (FARINA et al., 1996). Dies ergibt sich vorwiegend aufgrund der Tatsache, dass der Infektion des Menschen über den direkten Kontakt zu Wiederkäuern eine besondere Bedeutung zugesprochen wird und in Folge auch durch vom Rind stammende, insbesondere zum Rohverzehr vorgesehene Lebensmittel (BÜLTE und HECKÖTTER, 1997; BÜLTE, 2001). In diesem Zusammenhang ist eine hygienisch einwandfreie, schlachttechnologische Herrichtung der Tierkörper von besonderer Bedeutung, da im Darmtrakt bzw. Kot des Rindes vorkommende resistente VTEC während des Schlachtvorgangs mittels Fäzes den Schlachttierkörper kontaminieren und somit durch den Verzehr von Lebensmitteln bovinen Ursprungs auf den Menschen übertragen werden können (AARESTRUP et al., 1999).

5.2.3 Resistenzvergleich bei Stämmen aus Lebensmitteln und Kot

Beim Vergleich der Ergebnisse von den aus bovinen Lebensmitteln und Fäzes kultivierten VTEC-Stämmen erwiesen sich insgesamt 17,1 % der aus Lebensmitteln und 12,3 % der aus

Kot isolierten Stämme als resistent, wobei jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen waren (Chi²-Test, SACHS, 1997 bzw. „Exakter Test von Fisher“, FELDMAN und KLINGER, 1963; SACHS, 1997). Bei der Beurteilung der einzelnen Wirkstoffe ließen sich für den Wirkstoff Cotrimoxazol bei Stämmen aus Lebensmitteln häufiger Unempfindlichkeiten feststellen (2,9 %) als bei aus Kot isolierten VTEC (1,8 %), und im Gegensatz dazu waren für die Substanzen Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Nalidixinsäure und Tetrazyklin bei den Stämmen aus Fäzes häufiger Unempfindlichkeiten zu ermitteln (Ampicillin: 8,8 %, Amoxicillin/Clavulansäure: 0,9 %, Nalidixinsäure: 1,8 %, Tetrazyklin: 10,5 %) als bei den aus Lebensmittelproben kultivierten VTEC (Ampicillin: 7,1 %, Amoxicillin/Clavulansäure: 0 %, Nalidixinsäure: 0 %, Tetrazyklin: 10 %). Analog zu der Betrachtung der Wirkstoffe insgesamt waren jedoch auch hier keine auffälligen Differenzen aufzeigbar; lediglich Resistenzen gegenüber dem Antibiotikum Gentamicin waren bei den Stämmen aus Kot signifikant häufiger zu verzeichnen.

In der Literatur sind beim Vergleich von VTEC-Stämmen aus Kot und Lebensmitteln unterschiedliche Ergebnisse aufgeführt. So ergaben die Erhebungen von MORA et al. (2005) bei der Betrachtung aller getesteten Antibiotika insgesamt für VTEC aus Rinderhackfleisch häufiger Unempfindlichkeiten (55,4 %) als bei anderen (keine Lebensmittel) VTEC-Stämmen bovinen Ursprungs (40,3 %). Ebenso waren für die einzelnen Wirkstoffe Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Piperacillin, Cefalotin, Cefazolin, Cefuroxim, Cefoxitin, Streptomycin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Tobramycin, Tetrazyklin, Chloramphenicol, Nitrofurantoin, Nalidixinsäure, Sulfisoxazol, Trimethoprim und Cotrimoxazol bei den aus Rinderhackfleisch kultivierten Stämmen häufiger Resistenzen festzustellen als bei den nicht aus bovinen Lebensmitteln isolierten VTEC; lediglich bei den Wirkstoffen Aztreonam und Cefotaxim erwiesen sich im Gegensatz zu den Stämmen anderer boviner Herkunft (Resistenzen von 0,5 %) alle Stämme aus Rinderhackfleisch als sensibel. Auch WALSH et al. (2006) ermittelten bei der gesamtheitlichen Betrachtung aller antimikrobiellen Wirkstoffe bei aus Rinderhackfleisch kultivierten Stämmen sehr viel höhere Unempfindlichkeiten (37,8 %) als in sonstigen, nicht aus bovinen Lebensmitteln isolierten VTEC-Stämmen (8,6 %; Rinderfell und klinische Proben). Bei der Beurteilung der einzelnen Substanzen wurden desweiteren für 12 der Wirkstoffe (Ampicillin, Cefachlor, Cefixim, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Doxycyclin, Minocyclin, Nalidixinsäure, Streptomycin, Sulfonamide, Tetrazyklin, Trimethoprim) bei den Stämmen aus Rinderhackfleisch höhere Resistenzhäufigkeiten nachgewiesen als für die bovinen Stämme anderen Ursprungs; lediglich

für die Antibiotika Kanamycin, Moxalactam und Norfloxacin waren bei den aus klinischen Proben und aus Rinderfell isolierten VTEC häufiger Resistenzen festzustellen. Im Einklang mit den Resultaten von MORA et al. (2005) und WALSH et al. (2006) detektierten auch KLEIN und BÜLTE (2003) Resistenzen von 93,3 % bei Stämmen aus Rinderhackfleisch und von 60,0 % bei VTEC aus Rinderkot, wobei die aus Hackfleisch isolierten Stämme gegen die Wirkstoffe Ampicillin/Sulbactam, Cefalotin, Chloramphenicol und Tetrazyklin Resistenzen aufwiesen und die Stämme aus Fäzes lediglich gegen Cefalotin. Abweichend zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen befand sich keiner der fünf aus Fleisch kultivierten Stämme bei den Untersuchungen von BETTELHEIM et al. (2003) unter den 6,0 % resistenten bovinen VTEC-Stämmen, so dass abschließend keine einheitliche Aussage darüber getroffen werden kann, in welchen VTEC-Stämmen unterschiedlichen Ursprungs häufiger Resistenzen aufzufinden sind.

5.2.4 Zusammenhang von Resistenzen und Virulenzfaktoren

Als weiterer Aspekt wurde in den eigenen Untersuchungen eine mögliche Korrelation zwischen den Resistenzhäufigkeiten und dem Vorkommen von Virulenzfaktoren betrachtet, da einigen Literaturstellen solche Assoziationen zu entnehmen sind (SCHMIDT et al., 1998; SCHROEDER et al., 2002a; MORA et al., 2005), wohingegen andere Autoren keinen solchen Zusammenhang feststellen konnten (STEPHAN und SCHUMACHER, 2001; KLEIN und BÜLTE, 2003).

Daher wurde in der eigenen Arbeit für alle aus Lebensmittel- und Kotproben isolierten Stämme geprüft, wie viele sensible und wie viele unempfindliche VTEC-Stämme zur Bildung von VT 1, VT 2 oder VT 1 und VT 2 in der Lage sind bzw. wie viele Stämme über kein Verotoxin-Bildungsvermögen verfügen und lediglich das *eae*-Gen besitzen. Letztere wurden ebenfalls in die Betrachtungen einbezogen, da solche VTEC-Stämme ihre Verotoxingene verloren haben. Dies kann aufgrund der Lokalisation der Gene auf Bakteriophagen (STROCKBINE et al., 1986; STROCKBINE et al., 1988) der Fall sein (KARCH et al., 1992; MELLMANN et al., 2005; BIELASZEWSKA et al., 2007). Mithilfe statistischer Auswertungen war darlegbar, dass sich das jeweilige Vorkommen des Verotoxintyps bzw. der -typen ebenso wie das alleinige Vorhandensein des *eae*-Gens bei den aus Fäzes kultivierten Stämmen signifikant unterschiedlich auf die Resistenzhäufigkeiten auswirkt. Dementsprechend waren bei VTEC

mit VT 1-Bildungsvermögen am häufigsten antimikrobielle Resistenzen feststellbar, gefolgt von Stämmen mit dem *vtx2*-Gen bzw. dem *vtx1*- und *vtx2*-Gen. Am niedrigsten waren die Resistenzhäufigkeiten bei Stämmen, die keine für Verotoxine codierenden Gene besaßen. Abweichend hierzu waren bei den aus Lebensmitteln isolierten Stämmen die Unterschiede zwischen dem Vorkommen der unterschiedlichen Varianten nicht auffällig.

Ähnlich der auffälligen Assoziationen bei den in der eigenen Arbeit verwendeten aus bovinen Kotproben isolierten Stämmen brachten auch SCHMIDT et al. (1998) bei der Untersuchung humaner VTEC-Stämme am häufigsten das VT 1-Bildungsvermögen (68,4 %) mit Resistenzen in Zusammenhang, wobei sich gleich viele resistente VTEC unter den Stämmen mit *vtx2*-Gen (15,8 %) bzw. mit *vtx1*- und *vtx2*-Gen (15,8 %) feststellen ließen. Prinzipiell analoge Ergebnisse lieferten die Erhebungen von MORA et al. (2005) in Bezug auf VTEC-Stämme unterschiedlichen Ursprungs. So wies diese Arbeitsgruppe bei non-O157:H7-VTEC mit für VT 1 codierenden Genen häufiger Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika (Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Piperacillin, Cefalotin, Streptomycin, Kanamycin, Neomycin, Chloramphenicol, Trimethoprim und Cotrimoxazol) nach als bei Stämmen mit VT 2- oder VT 1- und VT 2-Bildungsvermögen. Abweichend hierzu besaßen alle von FARINA et al. (1996) ermittelten resistenten Stämme das *vtx1*- und zusätzlich das *vtx2*-Gen.

Desweiteren stellten MORA et al. (2005) eine positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein des *eae*-Gens und den Resistenzhäufigkeiten dar. So wurden bei non-O157-VTEC mit vorhandenem *eae*-Gen höhere antimikrobielle Resistenzen gegen die Wirkstoffe Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Piperacillin, Streptomycin, Kanamycin, Neomycin, Tetrazyklin, Chloramphenicol und Sulfisoxazol ermittelt als bei Stämmen ohne das genannte Virulenzgen. Bei der Überprüfung, inwiefern das Vorkommen des *eae*-Gens mit der Häufigkeit von antimikrobiellen Resistenzen bei VTEC-Stämmen in Bezug zu bringen ist, ergab sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass bei den aus bovinen Fäzes isolierten Stämmen hochsignifikante Unterschiede auszuwerten waren, da bei *eae*-Gen-Vorkommen eine viel größere Resistenzprävalenz auffällig wurde. Dagegen ließen sich für die aus Lebensmitteln kultivierten Stämme wiederum keine auffälligen Unterschiede ausmachen (χ^2 -Test, SACHS, 1997).

Zusammenfassend ist gemäß der genannten Literaturstellen und auch der eigenen Ergebnisse auf die Korrelation zwischen Resistenzhäufigkeiten und dem Vorkommen von Virulenzgenen

(*vtx*-Gene und *eae*-Gen) bei VTEC-Stämmen hinzuweisen, auch wenn sich die Zusammenhänge in den eigenen Untersuchungen nur für die Stämme aus Kot als statistisch signifikant erwiesen.

5.2.5 Homogenität zwischen den betrachteten Zeiträumen

Ein weiterer Gesichtspunkt dieser Arbeit war die Frage, inwieweit sich Resistenzen der bovinen VTEC-Stämme innerhalb der einbezogenen Jahre homogen verteilen. Zur Auswertung wurden die in Tabelle 46 dargestellten Beobachtungszeiträume verwendet.

Tabelle 46: Beobachtungszeiträume für den Test auf Homogenität

Matrix	Zeiträume				
Lebensmittel	1995-1996	1997	1998	1999	2000-2002
Kot	1987	1988-1990	1993-1996	1997-1999	2000-2001

Auf diese Weise sollte eine Aussage getroffen werden können, inwiefern in gewissen Jahren besonders hohe bzw. niedrige Resistenzen aufzeigbar sind. Dabei ergab sich bei Betrachtung aller getesteten Antibiotika zusammen für die Stämme aus Kot eine statistisch signifikante Inhomogenität innerhalb der Beobachtungszeiträume, wohingegen bei den aus Lebensmitteln isolierten VTEC keine Auffälligkeiten feststellbar waren („Verallgemeinerter Exakter Test von Fisher“, Eigenentwicklung der Biomathematik), so dass die Resistenzhäufigkeiten hier relativ homogen verteilt zu sein schienen. Ansonsten ließen sich signifikante Unterschiede lediglich bei der Beurteilung der Wirkstoffe Ampicillin und Tetrazyklin bei den aus Kot kultivierten Stämmen verzeichnen.

Während somit bei den Stämmen aus Lebensmitteln in allen Beobachtungszeiträumen Resistenzen festgestellt wurden, waren auffälligerweise bei den aus Kot isolierten VTEC zwei Zeiträume zu ermitteln, innerhalb derer überhaupt keine Unempfindlichkeiten zu verzeichnen waren (bei allen Antibiotika gesamt und ebenso bei den Wirkstoffen Ampicillin und Tetrazyklin). Dabei handelt es sich zum Einen um das Jahr 1987, wobei festzuhalten gilt, dass auch im Jahr 1988 keine unempfindlichen VTEC-Stämme ausgemacht werden konnten (Zeitraum 1988-1990) und ebenso um den Zeitraum 2000 bis 2001. Auch BÜLTE et al. (1990) wiesen bei diesen in frühen Jahren kultivierten Stämmen bovinen Ursprungs keine

Unempfindlichkeiten gegen die überprüften antimikrobiellen Wirkstoffe (Ampicillin, Chloramphenicol, Gentamicin, Kanamycin, Sulfadimidin/Trimethoprim und Tetrazyklin) nach. Dahingegen wurden in den nachfolgenden Jahren sowohl in den eigenen Untersuchungen als auch in der Studie von MORA et al. (2005) (1992-1999) Resistenzen bei von Rindern isolierten VTEC-Stämmen ermittelt.

Der Aspekt, dass sich in den Jahren 2000 und 2001 alle Stämme aus Kot als sensibel erwiesen, kann nicht mit einem Resistenzrückgang in diesem Zeitraum erklärt werden, da in aus Lebensmittelproben isolierten VTEC abweichend dazu Resistenzen zu bestimmen waren (Zeitraum 2000-2002). Allerdings ließen sich diese lediglich im Jahr 2002 verzeichnen; im Jahr 2000 waren analog zu den Stämmen aus Fäzes keine Unempfindlichkeiten nachzuweisen.

5.2.6 Resistenzzunahme bzw. -abnahme

Vielfach wurde eine mögliche Resistenzzunahme aufgrund hoher ermittelter Unempfindlichkeiten bei VTEC-Stämmen unterschiedlichen Ursprungs postuliert (FARINA et al., 1996; SCHROEDER et al., 2002a; WHITE et al., 2002; MORA et al., 2005), während andere Studien ein relativ geringes Resistenzvorkommen signalisierten (SCHROEDER et al., 2002b; WALSH et al., 2006), was partiell mit der Anzahl der getesteten Antibiotika in Zusammenhang gebracht wurde (MORA et al., 2005). Auch in dieser Arbeit wurde der Fragestellung bezüglich eines auffälligen zeitlichen Trends der Resistenzhäufigkeiten bei den einbezogenen bovinen VTEC-Stämmen mit besonderem Interesse nachgegangen, wobei zum Einen die Resistenzsituation allgemein und zum Anderen die Auffälligkeiten hinsichtlich einzelner Wirkstoffe betrachtet wurden. Die statistische Auswertung mithilfe der logistischen Regression (DIXON, 1993) erbrachte jedoch weder für Stämme aus Kot noch für VTEC aus Lebensmitteln einen nachweisbaren zeitlichen Trend, d.h., weder für alle antimikrobiellen Substanzen gesamt noch für einzelne Wirkstoffe war eine signifikante Zu- oder Abnahme der Resistenzhäufigkeiten bei den VTEC-Stämmen zu verzeichnen, wobei darauf hinzuweisen ist, dass die letzten einbezogenen VTEC aus dem Jahr 2002 stammten. Die in einigen Jahrgängen bei den aus Fäzes kultivierten Stämmen sehr hohen Unempfindlichkeiten von 100 % sind durch die niedrige Anzahl der getesteten Stämme zu erläutern und spiegeln keine zwischenzeitliche Zunahme der Resistenzhäufigkeiten wider.

Vergleicht man die in verschiedenen Arbeiten ermittelten Resistenzprävalenzen von bovinen VTEC-Stämmen (unabhängig welchen Ursprungs) bezüglich eines zeitlichen Trends, weichen die Ergebnisse beachtlich voneinander ab. Während BÜLTE et al. im Jahr 1990 bei der Untersuchung von 36 aus Mastbullen und 28 aus Milchrindern kultivierten Stämmen von keiner Resistenz gegenüber den sechs getesteten Antibiotika (Ampicillin, Kanamycin, Gentamicin, Tetrazyklin, Chloramphenicol und Sulfadimidin/Trimethoprim) in Deutschland berichteten, demonstrierten KLEIN und BÜLTE (2003) bei der Überprüfung von bovinen VTEC-Stämmen aus den Jahren 1987 bis 1998 hohe Unempfindlichkeiten von 60,0 % (Kot) bzw. 93,3 % (Hackfleisch). Bei den Angaben der zuletzt genannten Arbeitsgruppe ist hervorzuheben, dass auch bei diesen Untersuchungen keine Unempfindlichkeiten bei den in den ersten Jahren (1987-1988) isolierten Stämmen gefunden wurden, sondern lediglich bei den VTEC späteren Isolationsursprungs. Zudem waren vorwiegend Resistenzen gegen den Wirkstoff Cefalotin (Rinderhackfleisch: 22 der 28 resistenten Stämme; Rinderkot: alle fünf resistenten Stämme) nachzuweisen. Auch MORA et al. (2005) wiesen bei Stämmen aus dem Zeitraum 1992 bis 1999 (Spanien) hohe Auffälligkeiten zwischen 40,3 % (gesunde Rinder) und 55,4 % (Rinderhackfleisch) nach. So lagen bei den VTEC von gesunden Rindern gegen 21 und bei aus bovinem Hackfleisch isolierten Stämmen gegen 19 der 26 einbezogenen Wirkstoffe (Ampicillin [gesunde Rinder: 6,4 % vs. Stämme aus Hackfleisch: 15,4 %], Amoxicillin/Clavulansäure [1,1 % vs. 4,6 %], Piperacillin [2,7 % vs. 10,8 %], Aztreonam [0,5 % vs. 0 %], Cefalotin [1,2 % vs. 10,8 %], Cefazolin [0,5 % vs. 3,1 %], Cefuroxim [0,5 % vs. 1,5 %], Cefotaxim [0,5 % vs. 0 %], Cefoxitin [0,2 % vs. 3,1 %], Streptomycin [27,4 % vs. 41,5 %], Gentamicin [0,8 % vs. 3,1 %], Kanamycin [6,2 % vs. 7,7 %], Neomycin [4,3 % vs. 6,2 %], Tobramycin [0,9 % vs. 3,1 %], Tetracyclin [31,5 % vs. 38,5 %], Chloramphenicol [4,9 % vs. 15,4 %], Nitrofurantoin [0,4 % vs. 1,5 %], Nalidixinsäure [1,6 % vs. 6,2 %], Sulfisoxazol [35,8 % vs. 41,5 %], Trimethoprim [6,6 % vs. 23,1 %] und Cotrimoxazol [6,6 % vs. 23,1 %]) Resistenzen vor. Dahingegen waren lediglich bei der Überprüfung gegen Imipenem, Ceftriaxon, Ceftazidim, Amikacin und Ciprofloxacin keine Unempfindlichkeiten festzustellen. Die aus bovinem Hackfleisch isolierten Stämme zeigten somit gegen die gleichen Substanzen Resistenzen, lediglich gegen die Wirkstoffe Aztreonam und Cefotaxim waren sie im Gegensatz zu den VTEC aus gesunden Rindern empfindlich. Sowohl bei den Stämmen aus Rinderhackfleisch als auch bei den VTEC aus gesunden Rindern waren am häufigsten Resistenzen gegen die drei Wirkstoffe Sulfisoxazol, Tetrazyklin und Streptomycin aufzufinden. In der Schweiz isolierte VTEC (Coli-Mastitis) aus den Jahren 1996 bis 1997 wiesen Resistenzen von 25,0 % (Ampicillin, Neomycin, Tetrazyklin, Sulfonamid) auf

(STEPHAN und KÜHN, 1999), wohingegen bei den Stämmen des Zeitraums 1997 bis 1999 höhere Auffälligkeiten von 34,8 % (Rinderhackfleisch, Schlachttierkörper, Kälber, Mastitis) gefunden wurden (STEPHAN und SCHUMACHER, 2001). Abweichend hierzu wurden in Australien bei 83 aus Lebensmitteln und Kot bovinen Ursprungs (gastrointestinal kranke Tiere) kultivierten VTEC-Stämmen (1996 bis 2001) lediglich Resistenzen von 6,0 % gegen die Wirkstoffe Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin, Sulfathiazol, Tetrazyklin und Trimethoprim ermittelt (BETTELHEIM et al., 2003).

Die Erhebungen von MURPHY et al. (2005, 2007) bezüglich von Milchfiltern isolierten Stämmen ergaben divergierende Resultate zwischen 6,3 % (gegen Streptomycin) bei VTEC aus den Jahren 2001 bis 2003 und 40,0 % (1. Stamm: Streptomycin, 2. Stamm Ampicillin, Cefalotin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Amoxicillin/Clavulansäure, Streptomycin, Tetrazyklin) bei Erregern aus dem Zeitraum 2004 bis 2005.

Desweiteren detektierten WALSH et al. (2006) je nach Isolationsursprung sehr unterschiedliche Resistenzprävalenzen von 6,4 % (Rinderfell; Ampicillin, Cefachlor, Kanamycin, Minocyclin, Moxalactam, Nalidixinsäure, Norfloxacin, Streptomycin, Sulfonamide, Tetrazyklin), 33,3 % (Rinder, klinische Proben; Ampicillin, Kanamycin, Minocyclin, Streptomycin, Sulfonamide, Tetrazyklin) bzw. 37,8 % (Rinderhackfleisch; Ampicillin, Cefachlor, Chloramphenicol, Doxycyclin, Kanamycin, Monocyclin, Nalidixinsäure, Streptomycin, Sulfonamide, Tetrazyklin, Trimethoprim). Keiner der Stämme zeigte eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Cefixim und Ciprofloxacin.

Aufgrund dieser äußerst unterschiedlichen Ergebnisse aus den verschiedenen Ländern und der diversen Arbeiten kann somit bezüglich der VTEC-Stämme bovinen Ursprungs kein aussagekräftiger zeitlicher Trend dargestellt werden.

Eine Betrachtung der in unterschiedlichen Arbeiten verzeichneten Resistenzen humaner VTEC-Stämme aus verschiedenen Ländern ergibt ähnlich schwankende Häufigkeiten. So wiesen FARINA et al. (1996) bei im Zeitraum von 1988 bis 1994 in Italien isolierten Stämmen gegenüber den 12 einbezogenen antimikrobiellen Wirkstoffen (Ampicillin, Ceftazidim, Ceftriaxone, Cefalotin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Gentamicin, Streptomycin, Sulphisoxazol, Tetrazyklin und Sulfamethoxazol/Trimethoprim) eine 50 % ige Resistenz nach. Dabei bleibt anzumerken, dass sich am häufigsten Unempfindlichkeiten gegen die Substanzen Streptomycin (45,5 %), Sulfisoxazol (40,9 %) und Tetrazyklin (31,8 %) feststellen ließen und dass es sich bei den überprüften VTEC um Stämme von erkrankten Menschen handelte (blutige Diarrhö, HUS). Abweichend zu diesen Resultaten ermittelten

BETTELHEIM et al. (2003) lediglich bei 5,1 % der in den Jahren 1987 bis 1992 in Australien kultivierten Erregern Unempfindlichkeiten (gegen die Wirkstoffe Ampicillin, Kanamycin, Spektinomycin, Streptomycin, Sulfathiazol, Tetrazyklin und Trimethoprim) und SCHMIDT et al. (1998) bestimmten bei VTEC-Stämmen aus dem Jahr 1996 Resistenzen von 11,4 %, wobei hier die Substanzen Ampicillin, Piperacillin, Tetrazyklin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Chloramphenicol und Streptomycin aufzuführen sind (alle VTEC sensibel gegenüber: Cefotaxim, Ceftazidim, Gentamicin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, Imipenem). Bei diesen Untersuchungen ist die Tatsache hervorzuheben, dass von HC-Patienten isolierte Stämme häufiger Auffälligkeiten zeigten (17,2 %) als VTEC von HUS-Betroffenen (8,2 %) bzw. von gesunden Menschen (7,3 %). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen waren bei Stämmen aus dem Zeitraum 1992 bis 1999 (Spanien) wiederum Unempfindlichkeiten von nahezu 40 % zu verzeichnen (MORA et al., 2005), wobei sich dabei am häufigsten Resistenzen gegen die Wirkstoffe Sulfisoxazol (32,6 %), Tetrazyklin (31,9 %), Streptomycin (31,9 %) und Ampicillin (18,8 %) nachweisen ließen. Auch VTEC-Stämme (1997 bis 1999) aus der Schweiz erwiesen sich zu 27,7 % als resistent, wobei es sich um von Arbeitern aus der Fleischwarenindustrie isolierte Erreger handelte (STEPHAN und SCHUMACHER, 2001). Divergierend hierzu sind die Erhebungen von WALSH et al. (2006), die relativ niedrige Resistenzen von 9,5 % dokumentierten. So wurden zwar auch Unempfindlichkeiten gegen die antimikrobiellen Wirkstoffe Ampicillin (4,8 %), Nalidixinsäure (4,8 %) und Streptomycin (9,5 %) nachgewiesen, jedoch nicht gegenüber Tetrazyklinen und Sulfonamiden, gegen die in anderen Arbeiten (FARINA et al., 1996; SCHMIDT et al., 1998; MORA et al., 2005) häufig Resistenzen beschrieben werden.

Zusammenfassend bleibt somit festzuhalten, dass sowohl bei der Beurteilung humaner VTEC-Stämme, als auch bei der Betrachtung boviner Stämme bezüglich der Resistenzhäufigkeiten keine eindeutige Zu- oder Abnahme festgemacht werden kann, wie dies auch in den eigenen Untersuchungen der Fall war.

Für VTEC-Stämme oviner und capriner Herkunft sind in der Literatur äußerst divergierende Erhebungen zwischen 0 % (BETTELHEIM et al., 2003; MURPHY et al., 2007) und 20 % (MORA et al., 2005) bzw. 90 % bis hin zu 100 % (allerdings ausschließlich gegen den Wirkstoff Cefalotin; KLEIN und BÜLTE, 2003) beschrieben, wohingegen bei den aus Schweinen kultivierten VTEC-Stämmen fortwährend hohe Resistenzen von 56 % (abgesehen von 100 % iger Resistenz gegenüber Sulfonamiden; VON MÜFFLING et al., 2007), 71 % (BETTELHEIM et al., 2003) bzw. 75 % (STEPHAN und SCHUMACHER, 2001) aufgezeigt wurden. Somit sind auch

für VTEC-Stämme oviner, capriner und porciner Herkunft Aussagen über einen zeitlichen Trend nur schwer bis gar nicht zu treffen.

Abschließend muss, obwohl in der Literatur unterschiedliche Resistenzhäufigkeiten für VTEC-Stämme sowohl humanen als auch animalen Ursprungs angegeben sind, und die Aussagen bezüglich Resistenzentwicklungen sehr differieren, auf die Bedeutsamkeit weitergehender Resistenzuntersuchungen bei diesen pathogenen Erregern hingewiesen werden (SCHROEDER et al., 2002b). Empfehlungen werden in Bezug auf das Resistenzmonitoring auch dahingehend ausgesprochen, eine Verbindung zwischen Human- und Veterinärmedizin aufzubauen (WERNER und BRONZWAER, 2007).

6. Schlussfolgerungen

In Lebensmitteln und Fäzes der Tierart Rind sind resistente VTEC nachzuweisen, wobei sich die in dieser Arbeit diagnostizierten Unempfindlichkeiten als mittelmäßig hoch darstellten (15,0 %) und nur gegen sechs (Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Cotrimoxazol, Gentamicin, Nalidixinsäure und Tetrazyklin) der 11 getesteten antimikrobiellen Wirkstoffe aufzeigbar waren. Gegenüber Fluorchinolonen (Ciprofloxacin, Levofloxacin), Cephalosporinen (Cefotaxim, Cefuroxim) und Carbapenemen (Meropenem) erwiesen sich alle Stämme als sensibel. Ein Vergleich der Resistenzprävalenzen von Stämmen aus Lebensmitteln und Kot zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Matrices, wobei sich die aus Fäzes isolierten Stämme gegenüber sechs Substanzen als resistent erwiesen und die aus Lebensmitteln kultivierten Stämme lediglich gegen drei der getesteten Antibiotika. Demnach muss sowohl bei Kot als auch bei kontaminierten Lebensmitteln mit resistenten VTEC gerechnet werden, was aufgrund der in Literaturangaben beschriebenen Übertragungsmöglichkeiten solcher unempfindlicher Keime auf den Menschen ein Risiko darstellt. Zusätzlich ließ sich bei den Stämmen aus Kot eine positive Korrelation zwischen dem alleinigen VT 1-Bildungsvermögen und der Resistenzhäufigkeit feststellen, so dass bei *vtx1*-enthaltenden VTEC mit größerer Wahrscheinlichkeit von resistenten Stämmen ausgegangen werden muss, als bei solchen Erregern mit VT 2- bzw. VT 1- und VT 2-Bildungsvermögen. Ebenso sollte auch bei Vorhandensein des *eae*-Gens ein größeres Resistenzvorkommen angenommen werden. Innerhalb der einbezogenen Jahre war weder bei Stämmen aus Lebensmitteln noch bei VTEC aus Kot eine signifikante Zu- bzw. Abnahme der Resistenzhäufigkeiten zu bestimmen. So stellte sich heraus, dass die Unempfindlichkeiten in dem betrachteten Zeitraum (1987-2002) relativ homogen verteilt waren, weshalb nicht von einer sich vergrößernden Gefahr zu sprechen ist. Abschließend muss aufgrund der genannten Aspekte auf die Bedeutsamkeit der Rinder als mögliches Reservoir resistenter VTEC hingewiesen werden. Desweiteren ist, trotz der nur in Ausnahmefällen bei vorliegender humaner EHEC-Infektion anzuwendenden antimikrobiellen Therapiemaßnahmen, die Notwendigkeit zu weitergehenden Empfindlichkeitsprüfungen für diese darmpathogenen Erreger hervorzuheben.

7. Zusammenfassung

Wiederkäuer, v.a. Rinder gelten als Reservoir für enterovirulente Verotoxin-bildende *E. coli*-Stämme (VTEC). Untersuchungen von Rinderkot ergaben sehr unterschiedliche Konzentrationen dieses Erregers, und regelmäßig werden VTEC auch in Lebensmitteln bovinen Ursprungs nachgewiesen (BÜLTE und GOLL, 2006). Eine Infektion des Menschen resultiert vorwiegend aus dem direkten Kontakt zu Tieren bzw. aus dem Verzehr entsprechend kontaminierter Lebensmittel; ebenso stellt die Übertragung von Mensch zu Mensch einen wichtigen Infektionsweg dar (RKI, 2008a).

In der Literatur sind inhomogene Resistenzhäufigkeiten für aus Rindermatrizes isolierte VTEC erkennbar. Ungeachtet der häufig als niedrig taxierten Resistenzprävalenzen besteht die Gefahr einer Übertragung bereits resistenter Erreger auf den Menschen. Obwohl bei humanen VTEC-Infektionen nur in Ausnahmefällen Antibiotika anzuwenden sind, ist in der Ausbreitung resistenter Stämme eine Gefahr zukünftiger Behandlungsstrategien zu sehen, weshalb eine Überwachung der Empfindlichkeiten dieser Erreger zur Sicherung der öffentlichen Gesundheit erforderlich ist (SCHROEDER et al., 2002b).

In eigenen Untersuchungen sollte daher die Resistenzlage von VTEC-Stämmen der Tierart Rind gegenüber 11 Antibiotika (Ampicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Cefotaxim, Cefuroxim, Ciprofloxacin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Gentamicin, Levofloxacin, Meropenem, Nalidixinsäure und Tetracyclin) überprüft werden. Dazu wurden 254 VTEC-Stämme (140 aus Lebensmitteln und 114 aus Kot isolierte Stämme) aus den Jahren 1987 bis 2002 auf Resistenzen gegenüber den ausgewählten antimikrobiellen Wirkstoffen untersucht. Die Empfindlichkeitsbestimmung fand zunächst mithilfe des Agardiffusionstests statt. Die mit dieser Methode als „resistent“ bzw. „mäßig empfindlich“ eingestuften Stämme wurden daraufhin mit dem Epsilon-Test nochmals überprüft. Die Durchführung der Empfindlichkeitsprüfungen erfolgte gemäß dem CLSI-Dokument M31-A2 (NCCLS, 2002). Insgesamt erwiesen sich 24 (17,1 %) der Lebensmittel- und 14 (12,3 %) der Kotstämme gegen ein oder mehrere antimikrobielle Substanzen als unempfindlich. Gegenüber fünf der Antibiotika (Cefotaxim, Cefuroxim, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Meropenem) war keine Resistenz feststellbar. Obwohl sich die aus Fäzes isolierten Stämme gegenüber sechs, und die aus Lebensmitteln gewonnenen VTEC lediglich gegenüber drei Wirkstoffen als resistent erwiesen, erbrachte der Vergleich der Resistenzprävalenzen von aus Lebensmittel- und Kotproben kultivierten VTEC keine signifikanten Unterschiede. Bei den Stämmen aus Kot war im Gegensatz zu den aus Lebensmitteln isolierten VTEC eine Korrelation zwischen dem

Vorkommen der Virulenzgene *vtx1* sowie *eae* und der Resistenzhäufigkeit zu verzeichnen. Die Betrachtung eines möglichen zeitlichen Trends der Resistenzprävalenzen innerhalb der einbezogenen Jahre (1987-2002) erbrachte keine statistisch signifikante Resistenzzunahme oder –abnahme. Es stellte sich zudem heraus, dass die Unempfindlichkeiten in den gewählten Beobachtungszeiträumen bei den Stämmen aus Lebensmitteln relativ homogen verteilt waren, wohingegen bei den aus Fäzes isolierten VTEC sowohl bei der Betrachtung aller Antibiotika als auch für die zwei antimikrobiellen Wirkstoffe Ampicillin und Tetrazyklin signifikante Unterschiede auffällig wurden, da die Resistenzen ausschließlich in den Zeiträumen 1988 bis 1990, 1993 bis 1996 und 1997 bis 1999 aufzufinden waren.

Abschließend ist hervorzuheben, dass Rinder nicht nur als Reservoir für VTEC-Stämme im Allgemeinen, sondern auch für resistente Stämme dieser Pathogruppe anzusehen sind. Die Resistenzsituation sollte daher auch weiterhin kontrolliert werden.

8. Summary

Ruminants, particularly cattle are considered as a reservoir for verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC). Investigations of bovine faeces point out very different concentrations of the pathogens and VTEC are routinely detected in foods of bovine origin, too (BÜLTE und GOLL, 2006). Human infections basically result from direct contact with animals and the consumption of contaminated foods, respectively. Furthermore, the transmittance between humans represents an important way of infection (RKI, 2008a).

In literature, inhomogeneous prevalences of antibacterial resistance for VTEC-strains from bovine matrices are presented. In spite of the fact, that the detected frequentness of resistance is often low, there is a risk for the transfer of already resistant pathogens to humans. Although antibiotic agents are only used on rare occasions for human EHEC-infections, the emergence and dissemination of antimicrobial resistant strains indicate a threat to future therapeutic strategies. Due to this monitoring of antimicrobial susceptibility among this pathogen is required to ensure public health (SCHROEDER et al., 2002b).

Experiments were accomplished to test the resistance of bovine VTEC-strains to 11 antibiotic agents (ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefotaxime, cefuroxime, ciprofloxacin, sulfamethoxazole-trimethoprim, gentamicin, levofloxacin, meropenem, nalidixic acid and tetracycline). Therefore 254 VTEC-strains (140 from food and 114 from faeces), discovered during the years 1987-2002, were first examined for their antimicrobial susceptibility to the selected antibiotics with the disc diffusion method. For the strains found to be resistant or intermediate with this method, the minimum inhibitory concentrations (MICs) were investigated with the Epsilon-test-method. Testing was done according to the CLSI-document M31-A2 (NCCLS, 2002). Altogether 24 (17,1 %) of the food-strains and 14 (12,3 %) of the strains which were isolated from faeces proved resistance against one or more antibiotics. To five antibiotic agents (cefotaxime, cefuroxime, ciprofloxacin, levofloxacin and meropenem) all strains were sensitive. While the pathogens from faeces approved resistance to six substances, the food-strains showed resistance to three of them. Nevertheless, the resistance-rates of the strains isolated from food and faeces revealed no significant differences. In contrast to the food-strains, an association between a higher resistance to antibiotics and the presence of the virulence genes *vtx1* and *eae* was detected for faeces-strains. Consideration of possible development of antimicrobial resistance within the included years (1987-2002) pointed out neither statistical significant increase nor decrease of resistance. It turned out, that the lacking susceptibility of the food-strains was homogeneously distributed during the

regarded period, whereas the resistance of the faeces-strains showed significant differences as well as for all antibiotics as for the two antibiotic agents ampicillin and tetrazykline, because antimicrobial resistance could only be found in the periods 1988 to 1990, 1993 to 1996 and 1997 to 1999. In conclusion, the status of cattle as a reservoir not only for VTEC-strains but also for resistant strains of this group has to be accentuated. Accordingly sustained antimicrobial resistance screening of VTEC is of high significance.

9. Literaturverzeichnis

AARESTRUP, F. M. (2004)

Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. *J. Vet. Med. B.* 51, 380-388

AARESTRUP, F. M. und H. C. WEGENER (1999)

The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microb. Infect.* 1, 639-644

ABAAS, S., A. FRANKLIN, I. KÜHN, F. ORSKOV und I. ORSKOV (1989)

Cytotoxin activity on vero cells among *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in cats. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1294-1296

ABDUCH FÁBREGA, V. L., A. J. PIANTINO FERREIRA, F. R. DA SILVA PATRICIO, C. BRINKLEY und I. C. A. SCALETISKY (2002)

Cell-detaching *Escherichia coli* (CDEC) strains from children with diarrhea: identification of a protein with toxigenic activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 217, 191-197

ACHESON, D. W. K. (1998)

Nomenclature of enterotoxins. *Lancet* 351, 1003

ACKERMANN, H. (1998)

BIAS für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben. Version 7.0 Epsilon Verlag. Hochheim. Darmstadt

ADACHI, J. A., Z.-J. JIANG, J. J. MATHEWSON, M. P. VERENKAR, S. THOMPSON, F. MARTINEZ-SANDOVAL, R. STEFFEN, C. D. ERICSSON und H. L. DU PONT (2001)

Enterotoxigenic *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. *Clin. Infect. Dis.* 32, 1706-1709

AFZA, M., J. HAWKER, H. THURSTON, K. GUNN und J. ORENDI (2006)

An outbreak of *Escherichia coli* O157 gastroenteritis in a care home for the elderly. *Epidemiol. Infect.* 134, 1276-1281

AKE, J. A., S. JELACIC, M. A. CIOL, S. L. WATKINS, K. F. MURRAY, D. L. CHRISTIE, E. J. KLEIN und P. I. TARR (2005)

Relative nephroprotection during *Escherichia coli* O157:H7 infections: association with intravenous volume expansion. *Pediatrics* 115, 673-680

ALBERT, M. J., S. M. FARUQUE, A. S. G. FARUQUE, K. A. BETTELHEIM, P. K. B. NEOGI, N. A. BHUIYAN und J. M. KAPER (1996)

Controlled study of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children. *J. Clin. Microbiol.* 34, 717-719

AMMON, A., L. R. PETERSEN und H. KARCH (1999)

A large outbreak of haemolytic uraemic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H-. *J. Infect. Dis.* 179, 1274-1277

- ANDREOLI, S. P., H. TRACHTMAN, D. W. K. ACHESON, R. L. SIEGLER und T. G. OBRIG (2002)
Haemolytic uraemic syndrome: epidemiology, pathophysiology and therapy – Proceedings of the American Society of Pediatric Nephrology Educational Symposium, May 2000, Boston, Massachusetts, USA. *Pediatr. Nephrol.* 17, 293-298
- ANDREWS, J. M. for the BSAC Working Party on Susceptibility Testing (2001)
BSAC standardized disc susceptibility testing method. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 43-57
- ARBAO II (Antibiotic resistance in bacteria of animal origin-II) (2008)
Detailed project description ARBAO II.
http://www.dfvf.dk/Admin/Public/Download.aspx?file=Files/Filer/ARBAO/Projectdescription_ARBAO_II.pdf
- ARMSTRONG, G. L., J. HOLLINGSWORTH und J. G. MORRIS (1996)
Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol. Rev.* 18, 29-51
- BAUER, A. W., W. M. M. KIRBY, J. C. SHERRIS und M. TURCK (1966)
Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493-496
- BAUERFEIND, R., S. BARTH, A. TSCHOLCHIEW, G. VALLEJO und R. WEIB (2004)
Nachweis und Charakterisierung von Shiga-Toxin-bildenden *Escherichia coli* bei Zucht- und Mastschweinen in Deutschland. EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli
- BAUM, H. VON und R. MARRE (2005)
Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 503-511
- BAUMGART, J. (2002)
Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Ordner 1, Teil II.5.4.2
- BELL, C. (2002)
Report – Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Int. J. Food Microbiol.* 78, 197-216
- BELL, B. P., P. M. GRIFFIN, P. LOZANO, D. L. CHRISTIE, J. M. KOBAYASHI und P. I. TARR (1997)
Predictors of haemolytic uraemic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics* 100, E 12
- BERNIER, C., P. GOUNON und C. LE BOUGUÉNEC (2002)
Identification of an aggregative adhesion fimbria (AAF) type III-encoding operon in enteroaggregative *Escherichia coli* as a sensitive probe for detecting the AAF-encoding operon family. *Infect. Immun.* 70, 4302-4311
- BERTIN, Y., K. BOUKHORS, N. PRADEL, V. LIVRELLI und C. MARTIN (2001)
Stx2 suptyping of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new *stx2* subtype and correlation with additional virulence factors. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3060-3065

- BETTELHEIM, K. A., M. A. HORNITZKY, S. P. DJORDJEVIC und A. KUZEVSKI (2003)
Antibiotic resistance among verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and non-VTEC isolated from domestic animals and humans. J. Med. Microbiol. 52, 155-162
- BEUTIN, L. (1989)
Vorkommen, klinische Bedeutung und Erkennung von Verotoxin-produzierenden Stämmen von *E. coli*. Bundesgesundhbl. 4, 152-154
- BEUTIN, L. (1990)
Die Bedeutung und Erkennung von *Escherichia coli* als Krankheitserreger beim Menschen. Bundesgesundhbl. 9, 380-386
- BEUTIN, L. (1995)
Zur Epidemiologie von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland. Bundesgesundhbl. 11, 428-429
- BEUTIN, L. (1996)
Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundhbl. 11, 426-429
- BEUTIN, L. (1998)
Aufdeckung von Ausbrüchen bei Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) O157. Bundesgesundhbl. 6, 253-256
- BEUTIN, L. (1999)
Escherichia coli as a pathogen in dogs and cats. Vet. Res. 30, 285-298
- BEUTIN, L. und U. NIEMER (1995)
Erkennung, Verhütung und Bekämpfung von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) – Erfordernisse und Möglichkeiten für das öffentliche Gesundheitswesen. Bundesgesundhbl. 11, 422-427
- BEUTIN, L., J. PRADA, S. ZIMMERMANN, R. STEPHAN, I. ØRSKOV und F. ØRSKOV (1988)
Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). Zbl. Bakt. Hyg. A 267, 576-588
- BEUTIN, L., M. A. MONTENEGRO, I. ØRSKOV, F. ØRSKOV, J. PRADA, S. ZIMMERMANN und R. STEPHAN (1989)
Close association of verotoxin (shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 27, 2559-2564
- BEUTIN, L., D. GEIER, H. STEINRÜCK, S. ZIMMERMANN und F. SCHEUTZ (1993)
Prevalence and some properties of verotoxin (shiga-like toxin-) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. J. Clin. Microbiol. 31, 2483-2488
- BEUTIN, L., S. ALEKSIC, J. BOCKEMÜHL, A. SCHWARZKOPF und H. KARCH (1994)
Zur Epidemiologie von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 1993. Bundesgesundhbl. 10, 410-414

BEUTIN, L., S. ZIMMERMANN und K. GLEIER (1996)

Zur Epidemiologie und Diagnostik von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland - Mikrobiologisch nachgewiesene Fälle von Infektionen durch EHEC bei Menschen in den Jahren 1993-1995. Bundesgesundhbl. 9, 326-331

BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) (2005)

Kritischer als Gammelfleisch: Toxinbildende Bakterien und ihre Giftstoffe in Fleisch und Fleischerzeugnissen – Stellungnahme Nr. 004/2006 des BfR vom 21. Dezember 2005.

http://www.bfr.bund.de/cm/208/kritischer_als_gammelfleisch_toxinbildende_bakterien_und_ihre_giftstoffe_in_fleisch_und_fleischerzeugnissen.pdf

BIELASZEWSKA, M., R. KÖCK, A. W. FRIEDRICH, C. VON EIFF, L. B. ZIMMERHACKL, H. KARCH und A. MELLMANN (2007)

Shiga toxin-mediated haemolytic uraemic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? PLoS ONE 10, 1-8

BLANCO, J., E. A. GONZÁLES, P. ESPINOSA, M. BLANCO, J. I. GARABAL und M. P. ALONSO (1992)

Enterotoxigenic and necrotizing *Escherichia coli* in human diarrhea in Spain. Eur. J. Epidemiol. 8, 548-552

BLANCO, J., M. BLANCO, J. E. BLANCO, A. MORA, E. A. GONZÁLES, M. I. BERNÁRDEZ, M. P. ALONSO, A. COIRA, A. RODRIGUEZ, J. REY, J. M. ALONSO und M. A. USERA (2003)

Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. Exp. Biol. Med. 228, 345-351

BLANCO, M., J. E. BLANCO, J. BLANCO, E. A. GONZALES, A. MORA, C. PRADO, L. FERNANDEZ, M. RIO, J. RAMOS und M. P. ALONSO (1996)

Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. Epidemiol. Infect. 117, 251-257

BOCKEMÜHL, J. und H. KARCH (1996)

Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland 1994-1995. Bundesgesundhbl. 8, 290-296

BOERLIN, P., S. A. MC EWEN, F. BOERLIN-PETZOLD, J. B. WILSON, R. P. JOHNSON und C. L. GYLES (1999)

Association between virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. J. Clin. Microbiol. 37, 497-503

BOLMSTRÖM, A., S. ARVIDSON, M. ERICSSON und A. KARLSON (1988)

A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganism. In: program and abstracts of 28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Los Angeles, California, USA 23.-26. October. ASM, Washington DC, USA, Abstract 1209, p.325

- BONARDI, S., E. MAGGI, G. PIZZIN, S. MORABITO und A. CAPRIOLI (2001)
Faecal carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 47-53
- BONARDI, S., E. FONI, F. BRINDANI, C. BACCI, C. CHIAPPONI und P. CAVALLINI (2004)
Detection and characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 in cattle at slaughter. *New Microbiol.* 27, 255-261
- BONARDI, S., E. FONI, C. CHIAPPONI, A. SALSI und F. BRINDANI (2007)
Detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serogroups O157 and O26 in the cecal content and lymphatic tissue of cattle at slaughter in Italy. *J. Food Prot.* 70, 1493-1497
- BOUVET, J., M. P. MONTET, R. ROSSEL, A. LE ROUX, C. BAVAI, S. RAY-GUENIOT, C. MAZUY, V. ATRACHE und C. VERNZOY-ROZAND (2002)
Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and *E. coli* O157:H7 in French pork. *J. Appl. Microbiol.* 93, 7-14
- BROOKS, J. T., D. BERGMIRE-SWEAT, M. KENNEDY, K. HENDRICKS, M. GARCIA, L. MARENGO, J. WELLS, M. YING, W. BIBB, P. M. GRIFFIN, R. M. HOEKSTRA und C. R. FRIEDMANN (2004)
Outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H8 infections among attendees of a high school cheerleading camp. *J. Infect. Dis.* 38, 190-198
- BROOKS, J. T., E. G. SOWERS, J. G. WELLS, K. D. GREENE, P. M. GRIFFIN, R. M. HOEKSTRA und N. A. STROCKBINE (2005)
Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J. Infect. Dis.* 192, 1422-1429
- BROWN, C. A., B. G. HARMON, T. ZHAO und M. P. DOYLE (1997)
Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 27-32
- BROWNLIE, L. E. und F. H. GRAU (1967)
Effect of food intake on growth and survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* in the bovine rumen. *J. Gen. Microbiol.* 46, 125-134
- BRUCE, M. G., M. B. CURTIS, M. M. PAYNE, R. K. GAUTOM, E. C. THOMPSON, A. L. BENNETT und J. M. KOBAYASHI (2003)
Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Clark County, Washington, August, 1999. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 157, 1016-1021
- BÜLTE, M. (2001)
Nachweis und Charakterisierung von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli*-Stämmen (VTEC) aus unterschiedlichen Habitaten. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 114, 473-477
- BÜLTE, M. (2002)
Veterinärmedizinische Aspekte der Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme (EHEC). *Bundesgesundhbl. – Gesundheitsforsch. – Gesundheitsschutz* 45, 484-490

- BÜLTE, M. (2004)
Prävalenz von verotoxinogenen *Escherichia coli*-Stämmen (VTEC) unter besonderer Berücksichtigung des Serovars O157 in einer Mutterkuhherde. Arch. Lebensmittelhyg. 55, 121-144
- BÜLTE M. und M. GOLL (2006)
Pathogene Mikroorganismen – *Escherichia coli* und Shigellen. Behr's Verlag, 1. Auflage
- BÜLTE, M. und S. HECKÖTTER (1997)
Vorkommen und Bedeutung von O157 und anderen Verotoxin-bildenden *E. coli* bei Tieren und in Lebensmitteln. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 88, 665-680
- BÜLTE, M., M. A. MONTENEGRO, R. HELMUTH, T. TRUMPF und G. REUTER (1990)
Nachweis von Verotoxin-bildenden *E. coli* (VTEC) bei gesunden Rindern und Schweinen mit dem DNS-DNS-Koloniehybridisierungsverfahren. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 103, 380-384
- BÜRK, C., R. DIETRICH, G. AÇAR, M. MORAVEK, M. BÜLTE und E. MÄRTLBAUER (2003)
Identification and characterisation of a new variant of shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H19 of bovine origin. J. Clin. Microbiol. 41, 2106-2112
- BUROW, L. C., K. S. GOBIUS, B. A. VANSELOW und A. V. KLIEVE (2005)
A lack of predatory interaction between rumen ciliate protozoa and shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. 40, 117-122
- BUSCH, U., I. HUBER, S. HÖRMANSDORFER, H. KOCAK, U. BÖHM und H. RINDER (2004)
Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in der Routinediagnostik. EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004
- CALDERWOOD, S. B., F. AUCLAIR, A. DONOHUE-ROLFE, G. T. KEUSCH und J. J. MEKALANOS (1987)
Nucleotide sequence of shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 4364-4368
- CAPRIOLI, A., V. FALBO, L. G. RODA, F. M. RUGGERI und C. ZONA (1983)
Partial purification and characterisation of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. Infect. Immun. 39, 1300-1306
- CAPRIOLI, A., I. LUZZI, F. ROSMINI, C. RESTI, A. EDEFONTI, F. PERFUMO, C. FARINA, A. GOGLIO, A. GIANVITI und G. RIZZONI (1994)
Community-wide outbreak of haemolytic uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 169, 208-211
- CAPRIOLI, A., S. MORABITO, H. BRUGÈRE und E. OSWALD (2005)
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet. Res. 36, 289-311
- CHAPMAN, P. A., C. A. SIDDON, D. J. WRIGHT, P. NORMAN, J. FOX und E. CRICK (1993)
Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. Epidemiol. Infect. 111, 439-447

- CHAPMAN, P. A. und H. J. ACKROYD (1997)
Farmed deer as a potential source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157. Vet. Rec. 141, 314-315
- CHAPMAN, P. A., A. T. CERDÁN MALO, M. ELLIN, R. ASHTON und M. A. HARKIN (2001)
Escherichia coli O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. Int. J. Food Microbiol. 64, 139-150
- CHINA, B., V. PIRSON und J. MAINIL (1998)
Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium. Vet. Microbiol. 63, 249-259
- COIA, J. E., Y. JOHNSTON, N. J. STEERS und M. F. HANSON (2001)
A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. Int. J. Food Microbiol. 66, 63-69
- COMAYRAS, C., C. TASCA, S. Y. PÈRÉS, B. DUCOMMUN, E. OSWALD und J. DE RYCKE (1997)
Escherichia coli cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G₂/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. Infect. Immun. 65, 5088-5095
- COMITÉ DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE (2001)
Report 2000-2001, pp. 1-46. <http://www.sfm.asso.fr>.
- CONEDERA, G., P. DALVIT, M. MARTINI, G. GALIERO, M. GRAMAGLIA, E. GOFFREDO, G. LOFFREDO, S. MORABITO, D. OTTAVIANI, F. PATERLINI, G. PEZZOTTI, M. PISANU, P. SEMPRINI und A. CAPRIOLI (2004)
Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. Int. J. Food Microbiol. 96, 67-73
- CORNELIS, G. R. und F. VAN GIJSEGEM (2000)
Assembly and function of type III secretory systems. Annu. Rev. Microbiol. 54, 735-774
- CORNICK, N. A., S. L. BOOHER, T. A. CASEY und H. W. MOON (2000)
Persistant colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4926-4934
- CRAMPIN, M., G. WILLSHAW, R. HANCOCK, T. DJURETIC, C. ELSTOB, A. ROUSE, T. CHEASTY und J. STUART (1999)
Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with a music festival. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18, 286-288
- CRAY, W. C. und H. W. MOON (1995)
Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1586-1590
- CRAY, W. C., T. A. CASEY, B. T. BOSWORTH und M. A. RASMUSSEN (1998)
Effect of dietary stress on faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1975-1979

- DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial resistance Monitoring and Research Programme) (2008)
Danish Programme for surveillance of antimicrobial resistance in bacteria from livestock, foods and humans. <http://www.danmap.org/>
- DARGATZ, D. A., S. J. WELLS, L. A. THOMAS, D. D. HANCOCK und L. P. GARBER (1997)
Factors associated with the presence of *Escherichia coli* O157 in faeces of feedlot cattle. J. Food Prot. 60, 466-470
- DEAN-NYSTROM, E. A., B. T. BOSWORTH, W. C. CRAY und H. W. MOON (1997)
Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. Infect. Immun. 65, 1842-1848
- DE GRANDIS, S., H. LAW, J. BRUNTON, C. GYLES und C. A. LINGWOOD (1989)
Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. J. Biolog. Chem. 264, 12520-12525
- DE RYCKE, J. und E. OSWALD (2001)
Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation? FEMS Microbiol. Lett. 203, 141-148
- DE RYCKE, J., A. MILON und E. OSWALD (1999)
Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. Vet. Res. 30, 221-233
- DE SCHRIJVER, K., G. BUENS, B. POSSÉ, D. VAN DEN BRANDEN, O. OOSTERLYNCK, L. DE ZUTTER, K. EILERS, D. PIÉRARD, K. DIERICK, R. VAN DAMME-LOMBAERTS, C. LAUWERS und R. JACOBS (2008)
Outbreak of verocytotoxin-producing *E. coli* O145 and O26 infections associated with the consumption of ice cream produced at a farm, Belgium, 2007. Euro Surveill. 13 (2008)
- DIN (Deutsches Institut für Normung e.V.) (2000)
Medizinische Mikrobiologie und Immunologie: Diagnostische Verfahren. DIN-Taschenbuch Band 222, 3. Auflage, Beuth Verlag GmbH, Berlin, Köln
- DIXON, W. J. (1993)
BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London
- DONNENBERG, M. S., J. YU und J. B. KAPER (1993)
A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. J. Bact. 175, 4670-4680
- DONOHUE-ROLFE, A., G. T. KEUSCH, C. EDSON, D. HORLEY-LAWSON und M. JACEWICZ (1994)
Pathogenesis of *Shigella* diarrhea – IX. Simplified high yield purification of Shigella toxin and characterisation of subunit composition and function by the use of subunit-specific monoclonal and polyclonal antibodies. J. Exp. Med. 160, 1767-1781

- DOORDUYN, Y., C. M. DE JAGER, W. K. VAN DER ZWALUW, I. H. M. FRIESEMA, A. E. HEUVELINK, E. DE BOER, W. J. B. WANNET und Y. T. H. P. VAN DUYNHOVEN (2006) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157 outbreak, the Netherlands, September–October 2005. *Euro Surveill.* 11, 182-185
- DOYLE, M. P. und J. L. SCHOENI (1984) Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with haemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 855-856
- DREESMAN, J., H. R. RÖTTGERS, A. MELLMANN und M. PULZ (2007) Untersuchung eines EHEC-Ausbruchs mit 59 Fällen nach einem Ferienlager mit Rohmilchverzehr durch eine retrospektive Kohortenstudie. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11. Mai 2007
- DUFFELL, E., E. ESPIÉ, T. NICHOLS, G. K. ADAK, H. DE VALK, K. ANDERSON und J. M. STUART (2003) Investigation of an outbreak of *E. coli* O157 infections associated with a trip to France of schoolchildren from Somerset, England. *Euro Surv.* 8, 81-86
- DUFFY, G., C. WALSH, I. S. BLAIR und D. A. MC DOWELL (2006) Survival of antibiotic resistant and antibiotic sensitive strains of *E. coli* O157 and *E. coli* O26 in food matrices. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 179-186
- DUNDAS, S., W. T. A. TODD, A. I. STEWART, P. S. MURDOCH, A. K. R. CHAUDHURI und S. J. HUTCHINSON (2001) The central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: risk factors for the haemolytic uraemic syndrome and death among hospitalized patients. *Clin. Infect. Dis.* 33, 923-931
- DUNN, J. R., J. E. KEEN, D. MORELAND und R. A. THOMPSON (2004) Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer from Louisiana. *J. Wildlife Dis.* 40, 361-365
- EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) (2006) EARSS Annual Report 2005. http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202005_tcm61-34899.pdf
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2008) Enter-net. <http://ecdc.europa.eu/en/Activities/Surveillance/Enter-net>
- EFSA (European Food Safety Authority) und ECDC (European centre for diseases prevention and control) (2006) The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *EFSA J.* 94
- EFSA (European Food Safety Authority) (2007) Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types – Scientific opinion of the panel on biological hazards. *EFSA J.* 579, 1-61

- EFSA (European Food Safety Authority) (2008)
Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard – draft scientific opinion of the panel on biological hazards (6. März 2008).
http://www.efsa.europa.eu/EFSA/DocumentSet/biohaz_public_cons_amr_en.pdf
- EJIDOKUN, O. O., A. WALSH, J. BARNETT, Y. HOPE, S. ELLIS, M. W. SHARP, G. A. PAIBA, M. LOGAN, G. A. WILLSHAW und T. CHEASTY (2006)
Short Report: Human verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) O157 infection linked to birds. *Epidemiol. Infect.* 134, 421-423
- ELDER, R. O., J. E. KEEN, G. R. SIRAGUSA, G. A. BARKOCY-GALLAGHER, M. KOOHMARAIE und W. W. LAEGREID (2000)
Correlation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in faeces, hides and carcasses of beef cattle during processing. *PNAS* 97, 2999-3003
- ELLIOTT, S. J., S. SRINIVAS, M. J. ALBERT, K. ALAM, R. M. ROBINS-BROWNE, S. T. GUNZBURG, B. J. MEE und B. J. CHANG (1998a)
Characterisation of the roles of haemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-haemolytic *Escherichia coli* linked to human diarrhea. *Infect. Immun.* 66, 2040-2051
- ELLITOTT, S. J., L. A. WAINWRIGHT, T. K. MC DANIEL, K. G. JARVIS, Y. K. DENG, L.-C. LAI, B. P. MC NAMARA, M. S. DONNENBERG und J. B. KAPER (1998b)
The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28, 1-4
- ENNE, V. I., D. M. LIVERMORE, P. STEPHENS und L. M. C. HALL (2001)
Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* 357, 1325-1328
- ESAC (European Surveillance of Antimicrobial Consumption) (2008)
About ESAC. http://www.esac.ua.ac.be/main.aspx?c=*ESAC2&n=50103
- ESPIE, E., F. GRIMONT, V. VAILLANT, M. P. MONTET, I. CARLE, C. BAVAI, H. DE VALK und C. VERNIZY-ROZAND (2006)
O148 shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 992-998
- ETHELBERG, S., B. SMITH, M. TORPDAHL, M. LISBY, J. BOEL, T. JENSEN und K. MØLBAK (2007)
An outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 caused by beef sausage, Denmark 2007. *Euro Surveill.* 12. www.eurosurveillance.org
- FARINA, C., A. GOGGIO, G. CONEDERA, F. MINELLI und A. CAPRIOLI (1996)
Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 and other enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 351-353
- FELDMAN, S. E. und E. KLINGER (1963)
Short cut calculation of the Fisher-Yates “exact test”. *Psychometrika* 28, pp. 289-291

- FEUERPFIL, I., J. LOPEZ-PILA, R. SCHMIDT, E. SCHNEIDER und R. SZEZYK (1999)
Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. Bundesgesundhbl. Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 42, 37-50
- FISCHER, J. R., T. ZHAO, M. P. DOYLE, M. R. GOLDBERG, C. A. BROWN, C. T. SEWELL, D. M. KAVANAUGH und C. D. BAUMAN (2001)
Experimental and field studies of *Escherichia coli* O157:H7 in white-tailed deer. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1218-1224
- FISHER, I. S. (1999)
The Enter-net international surveillance network – how it works. Euro Surveill. 4, 73
- FLEISS, J. L. (1973)
Statistical Methods for Rates and Proportions. Wiley, New York
- FLUCKEY, W. M., G. H. LONERAGAN, R. WARNER und M. M. BRASHEARS (2007)
Antimicrobial Drug Resistance of *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from Cattle faeces, hides and carcasses. J. Food Prot. 70, 551-556
- FLUGS (Fachinformationsdienst Lebenswissenschaften, Umwelt und Gesundheit) (2007)
Antibiotika und Antibiotikaresistenzen. GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit). <http://www.gsf.de/flugs/neu/pdf/Antibiotika.pdf>.
- FREY, H. H. und W. LÖSCHER (2002)
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Enke-Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, 356-358
- FRIEDRICH, A. W., M. BIELASZEWSKA, W.-L. ZHANG, M. PULZ, T. KUCZIUS, A. AMMON und H. KARCH (2002)
Escherichia coli harboring shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J. Infect. Dis. 185, 74-84
- FRIESEMA, I., B. SCHIMMER, O. STENVERS, A. HEUVELINK, E. DE BOER, K. VAN DER ZWALUW, C. DE JAGER, D. NOTERMANS, I. VAN OUWERKERK, R. DE JONGE und W. VAN PELT (2007)
STEC O157 outbreak in the Netherlands, September-October 2007. Euro Surveill. 12, www.eurosurveillance.org
- FRUTH, A., R. PRAGER, D. SAGEBIEL, C. FRANK, K. ALPERS, J. DREESMANN, M. PULZ, A. FRIEDRICH, A. SPEICHER und P. ROGENTIN (2007)
HUS-Ausbruch durch Sorbitol-fermentierende enterohämorrhagische *E. coli* O157:H⁻ in Norddeutschland im Frühjahr/Sommer 2006. EHEC-Workshop 2007, Wildbad Kreuth, 9.-11. Mai 2007
- FUKUSHIMA, H. und R. SEKI (2004)
High numbers of shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan. FEMS Microbiol. Lett. 238, 189-197

- FUKUSHIMA, H., T. HASHIZUME, Y. MORITA, J. TANAKA, K. AZUMA, Y. MIZUMOTO, M. KANENO, M.-O. MATSU-URA, K. KONMA und T. KITANI (1999a)
Clinical experience in Sakai City hospital during the massive outbreak of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 infections in Sakai City, 1996. *Pediatr. Int.* 41, 213-217
- FUKUSHIMA, H., K. HOSHINA und M. GOMYODA (1999b)
Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in bovine faeces. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5177-5181
- GALLAND, J. C., D. R. HYATT, S. S. CRUPPER und D. W. ACHESON (2001)
Prevalence, antibiotic susceptibility and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1619-1627
- GALLIEN, P., H. KLIE, S. LEHMANN, D. PROTZ, R. HELMUTH, R. SCHÄFER und M. EHRLER (1994)
Nachweis Verotoxin-bildender *E. coli* in Feldisolaten von Haus- und landwirtschaftlichen Nutztieren in Sachsen-Anhalt. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 107, 331-334
- GANNON, V. P. J., C. L. GAYLES und R. W. FRIENDSHIP (1988)
Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. *Can. J. Vet. Res.* 52, 331-337
- GANNON, V. P., C. TEERLING, S. A. MASRI und C. L. GYLES (1990)
Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* shiga-like toxin II family. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1125-1135
- GARCÍA, A. und J. G. FOX (2003)
The rabbit as a new reservoir host of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg. Inf. Dis.* 9, 1592-1597
- GAUTHIER, A. und B. FINLAY (2002)
Type III secretion system inhibitors are potential antimicrobials. *ASM News* 68, 383-387
- GERBER, A., H. KARCH, F. ALLERBERGER, H. M. VERWEYEN und L. ZIMMERHACKL (2002)
Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the haemolytic uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J. Infect. Dis.* 186, 493-500
- GERMAP 2008 (2008)
Antibiotika-Resistenz und –Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland.
www.bvl.bund.de/germap2008
- GIAMMANCO, G. M., S. PIGNATO, F. GRIMONT, P. A. D. GRIMONT, A. CAPRIOLI, S. MORABITO und G. GIAMMANCO (2002)
Characterisation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated in Italy and France. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4619-4624
- GOLL, M. und M. BÜLTE (2004)
Vorkommen und Charakterisierung von *Escherichia coli* O157-Stämmen bei Pferden. EHEC-Workshop 2004, Wildbad Kreuth, 22.-24. Juli 2004

- GOMEZ, D., E. MILIWEBSKY, A. SILVA, N. DEZA, C. ZOTTA, O. COTELLA, E. MARTÍNEZ ESPINOSA, I. CHINEN, C. FERNÁNDEZ PASCUA und M. RIVAS (2005)
Isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains during a gastrointestinal outbreak at a day care center in Mar del Plata City. *Rev. Argent. Microbiol.* 37, 176-183
- GRAU, F. H., L. E. BROWNLIE und M. G. SMITH (1969)
Effects of food intake on numbers of *Salmonellae* and *Escherichia coli* in rumen and faeces of sheep. *J. Appl. Bact.* 32, 112-117
- GRAUKE, L. J., I. T. KUDVA, J. W. YOON, C. W. HUNT, C. J. WILLIAMS und C. J. HOVDE (2002)
Gastrointestinal tract location of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2269-2277
- GRIF, K., M. P. DIETRICH, H. KARCH und F. ALLERBERGER (1998)
Strain-specific differences in the amount of shiga toxin released from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 761-766
- GRIFFIN, P. M. und R. V. TAUXE (1991)
The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohaemorrhagic *E. coli* and the associated haemolytic uraemic syndrome. *Epid. Rev.* 13, 60-99
- GROSS, R. J., L. V. THOMAS, T. CHEASTY, N. P. DAY, B. ROWE, M. R. F. TOLEDO und L. R. TRABULSI (1983)
Enterotoxigenic and enteroinvasive *Escherichia coli* strains belonging to a new O group, O167. *J. Clin. Microbiol.* 17, 521-523
- GUNN, G. J., I. J. MC KENDRICK, H. E. TERNENT, F. THOMSON-CARTER, G. FOSTER und B. A. SYNGE (2007)
An investigation of factors associated with the prevalence of verocytotoxic *Escherichia coli* O157 shedding in Scottish beef cattle. *Vet. J.* 174, 554-564
- GUNZBURG, S. T., B. J. CHANG, S. J. ELLIOTT, V. BURKE und M. GRACEY (1993)
Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberly region of Western Australia. *J. Infect. Dis.* 167, 755-758
- HAMMERMUELLER, J., S. KRUTH, J. PRESCOTT und C. GYLES (1995)
Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. *Can. Vet. Res.* 59, 265-270
- HANCOCK, D. D., D. H. RICE, D. E. HERRIOTT, T. E. BESSER, E. D. EBEL und L. V. CARPENTER (1997a)
Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157 prevalence in cattle. *J. Food Prot.* 60, 363-366
- HANCOCK, D. D., D. H. RICE, L. A. THOMAS, D. A. DARGATZ und T. E. BESSER (1997b)
Epidemiology of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle. *J. Food Prot.* 60, 462-465

- HANCOCK, D., T. BESSER, J. LEJEUNE, M. DAVIS und D. RICE (2001)
The control of VTEC in the animal reservoir. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 71-78
- HARMON, B. G., C. A. BROWN, S. TKALCIC, P. O. E. MUELLER, A. PARKS, A. V. JAIN, T. ZHAO und M. P. DOYLE (1999)
Faecal shedding and rumen growth of *Escherichia coli* O157:H7 in fasted calves. *J. Food Prot.* 62, 574-579
- HARTUNG, M. (2007)
Ergebnisse der Zoonoseerhebung 2006 bei Lebensmitteln. *Fleischwirtsch.* 87, 109-117
- HEESEMAN, J. (1993)
Resistenzmechanismen gegen Betalaktamantibiotika. *Infect.* 21, 4-9
- HEUVELINK, A. E., F. L. A. M. VAN DEN BIGGELAAR, E. DE BOER, R. G. HERBES, W. J. G. MELCHERS, J. H. J. HUIS IN 'T VELD und L. A. H. MONNENS (1998a)
Isolation and characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J. Clin. Microbiol.* 36, 878-882
- HEUVELINK, A. E., F. L. A. M. VAN DEN BIGGELAAR, J. T. M. ZWARTKRUIS-NAHUIS, R. G. HERBES, R. HUYBEN, N. NAGELKERKE, W. J. G. MELCHERS, L. A. H. MONNENS und E. DE BOER (1998b)
Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3480-3487
- HIRUTA, N., T. MURASE und N. OKAMURA (2001)
An outbreak of diarrhea due to multiple antimicrobial-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 [ratio] H11 in a nursery. *Epidemiol. Infect.* 127, 221-227
- HOLLAND, R. E., A. SCHMIDT, N. SRIRANGANATHAN, S. D. GRIMES, R. A. WILSON, C. M. BROWN und R. D. WALKER (1996)
Characterisation of *Escherichia coli* isolated from foals. *Vet. Microbiol.* 48, 243-255
- HOLLAND, R. E., R. A. WILSON, M. S. HOLLAND, V. YUZBASIYAN-GURKAN, T. P. MULLANEY und D. G. WHITE (1999)
Characterisation of eae⁺ *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. *Vet. Microbiol.* 66, 251-263
- HOLT, J. G., N. R. KRIEG, P. H. A. SNEATH, J. T. STALEY und S. T. WILLIAMS (1994)
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins Verlag, 9. Auflage, 179-180
- HUPPERTZ, H. I., S. RUTKOWSKI, S. ALEKSIC und H. KARCH (1997)
Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in Western Europe. *Lancet* 349, 1660-1662
- HUYS, G., M. CNOCKAERT, J. M. JANDA und J. SWINGS (2003)
Escherichia albertii sp. nov., a diarrheagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 807-810

- HYMA, K. E., D. W. LACHER, A. M. NELSON, A. C. BUMBAUGH, J. M. JANDA, N. A. STROCKBINE, V. B. YOUNG und T. S. WHITTAM (2005)
Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. J. Bacteriol. 187, 619-628
- IGARASHI, T., J. INATOMI, A. WAKE, M. TAKAMIZAWA, H. KATAYAMA und T. IWATA (1999)
Failure of pre-diarrheal antibiotics to prevent haemolytic uremic syndrome in serologically proven *Escherichia coli* O157:H7 gastrointestinal infection. J. Pediatr. 135, 768-769
- IJIMA, K., I. KAMIOKA und K. NOZU (2008)
Management of diarrhea-associated haemolytic uraemic syndrome in children. Clin. Exp. Nephrol. 12, 16-19
- IRINO, K., M. A. M. F. KATO, T. M. I. VAZ, I. I. RAMOS, M. A. C. SOUZA, A. S. CRUZ, T. A. T. GOMES und M. A. M. VIEIRA (2005)
Serotypes and virulence markers of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. Vet. Microbiol. 105, 29-36
- ITO, H., A. TERA, H. KURAZONO, Y. TAKEDA und M. NISHIBUCHI (1990)
Cloning and nucleotide sequencing of verotoxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the haemolytic uraemic syndrome. Microb. Pathog. 8, 47-60
- ITO, T., E. AKINO und K. HIRAMATSU (1997)
Evaluation of antibiotics used for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 enteritis – effect of various antibiotics on extracellular release of verotoxin. Kansenshogaku Zasshi 71, 130-135
- JACKSON, M. P., R. J. NEILL, A. D. O'BRIEN, R. K. HOLMES und J. W. NEWLAND (1987)
Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for shiga-like toxin I and shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. FEMS Microbiol. Lett. 44, 109-114
- JARVIS, K. G. und J. KAPER (1996)
Secretion of extracellular proteins by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. Infect. Immun. 64, 4826-4829
- JARVIS, K. G., J. A. GIRÓN, A. E. JERSE, T. K. MC DANIEL, M. S. DONNENBERG und J. B. KAPER (1995)
Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 7996-8000
- JELACIC, J. K., T. DAMROW, G. S. CHEN, S. JELACIC, M. BIELASZEWSKA, M. CIOL, H. M. CARVALHO, A. R. MELTON-CELSA, A. D. O'BRIEN und P. I. TARR (2003)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: Bacterial genotypes and clinical profiles. J. Infect. Dis. 188, 719-729

- JELACIC, S., C. L. WOBBE, D. R. BOSTER, M. A. CIOL, S. L. WATKINS, P. I. TARR und A. E. STAPLETON (2002)
ABO and P1 blood group antigen expression and *stx* genotype and outcome of childhood *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J. Infect. Dis.* 185, 214-219
- JENSEN, C., S. ETHELBERG, A. GERVELMEYER, E. M. NIELSEN, K. E. P. OLSEN, K. MØLBAK and the outbreak investigation team (2006)
First general outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Denmark. *Euro Surveill.* 11, 55-58
- JOHNSEN, G., Y. WASTESON, E. HEIR, O. I. BERGET und H. HERIKSTAD (2001)
Escherichia coli O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 193-200
- JOHNSON, W. M. und H. LIOR (1988)
A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microbiol. Pathog.* 4, 103-113
- JONSSON, M. E., A. ASPÁN, E. ERIKSSON und I. VÅGSHOLM (2001)
Persistence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in calves kept on pasture and in calves kept indoors during summer months in a Swedish dairy herd. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 55-61
- KAPER, J. B., J. P. NATARO und H. L. T. MOBLEY (2004)
Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 123-140
- KARCH, H. und M. BIELASZEWSKA (2001)
Sorbitol-fermenting shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H⁻ strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics and microbiological diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2043-2049
- KARCH, H., T. MEYER, H. RÜSSMANN und J. HEESEMANN (1992)
Frequent loss of shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infect. Immun.* 60, 3464-3467
- KARCH, H., H.-I. HUPPERTZ, J. BOCKEMÜHL, H. SCHMIDT, A. SCHWARZKOPF und R. LISSNER (1997)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Germany. *J. Food Prot.* 60, 1454-1457
- KARCH, H., P. I. TARR und M. BIELASZEWSKA (2005)
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 405-418
- KARMALI, M. A. (1989)
Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 15-38
- KARMALI, M. A., B. T. STEELE, M. PETRIC und C. LIM (1983)
Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1, 619-620

- KAWANO, K., M. OKADA, T. HAGA, K. MAEDA und Y. GOTO (2008)
Relationship between pathogenicity for humans and stx genotype in shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 227-232
- KEENE, W. E., E. SAZIE, J. KOK, D. H. RICE, D. D. HANCOOK, V. K. BALAN, T. ZHAO und M. P. DOYLE (1997)
An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *JAMA* 277, 1229-1231
- KENNY, B. und B. B. FINLAY (1995)
Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 7991-7995
- KENNY, B., L. C. LAI, B. B. FINLAY und M. S. DONNENBERG (1996)
EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 20, 313-323
- KENNY, B., R. DE VINNEY, M. STEIN, D. J. REINSCHIED, E. A. FREY und B. B. FINLAY (1997)
Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91, 511-520
- KHAN, A., S. C. DAS, T. RAMAMURTHY, A. SIKADAR, J. KHANAM, S. YAMASAKI, Y. TAKEDA und G. BALAKRISHNAIR (2002)
Antibiotic resistance, virulence gene and molecular profiles of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2009-2015
- KIMMITT, P. T., C. R. HARWOOD und M. R. BARER (2000)
Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 458-465
- KLEIN, G. und M. BÜLTE (2003)
Antibiotic susceptibility pattern of *Escherichia coli* strains with verocytotoxic *E. coli*-associated virulence factors from food and animal faeces. *Food Microbiol.* 20, 27-33
- KOBAYASHI, H., J. SHIMADA, M. NAKAZAWA, T. MOROZUMI, T. POHJANVIRTA, S. PELKONEN und K. YAMAMOTO (2001)
Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 484-489
- KOBAYASHI, H., T. POHJANVIRTA und S. PELKONEN (2002)
Prevalence and characteristics of intimin- and shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 1071-1073
- KOKAI-KUN, J. F., A. R. MELTON-CELSA und A. D. O'BRIEN (2000)
Elastase in intestinal mucus enhances the cytotoxicity of shiga toxin type 2d. *J. Biol. Chem.* 275, 3713-3721
- KOLBERT, M. und P. M. SHAH (2002)
Diffusion oder Dilution: Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung im Routinelabor. *J. Lab. Med.*, 26, 420-424

- KONOWALCHUK, J., J. I. SPEIRS und S. STAVRIC (1977)
Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Inf. Immun. 18, 775-779
- KRAMER, T. (1960)
Edema disease of swine: I. study of haemolytic *Escherichia coli* strains isolated from cases of edema disease of swine in western Canada. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 24, 289-294
- KRESKEN, M. (2005)
Aktuelle Daten zur Resistenzsituation bei Bakterien gegenüber Antibiotika – Ergebnisse der PEG – Resistenzstudie 2004. Jahrespressekonferenz der PEG (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.), Berlin, 29.11.2005. www.p-e-g.org
- KRESKEN, M., D. HAFNER und N. VON ROSENSTIEL (1999)
Zeitliche Entwicklung der Antibiotikaresistenz bei klinisch wichtigen Bakterienspezies in Mitteleuropa – Ergebnisse der Longitudinalstudie der Arbeitsgemeinschaft „Bakterielle Resistenz“ der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus den Jahren 1975-1995. Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 42, 17-25
- KRESKEN, M., D. HAFNER, F.-J. SCHMITZ und T. A. WICHELHAUS (2006)
PEG-Resistenzstudie 2004 – Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. www.p-e-g.org
- KRISHNAN, C., V. A. FITZGERALD, S. J. DAKIN und R. J. BEHME (1987)
Laboratory investigation of outbreak of haemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7. J. Clin. Microbiol. 25, 1043-1047
- KUDVA, I. T., C. W. HUNT, C. J. WILLIAMS, U. M. NANCE und C. J. HOVDE (1997)
Evaluation of dietary influences on *Escherichia coli* O157:H7 shedding by sheep. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3878-3886
- KURIOKA, T., Y. YONOU, H. HARADA und E. KITA (1999)
Efficacy of antibiotic therapy for infection with shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in mice with protein-calorie malnutrition. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18, 561-571
- LAHTI, E., V. HIRVELÄ-KOSKI und T. HONKANEN-BUZALSKI (2001)
Occurrence of *Escherichia coli* O157 in reindeer (*Rangifer tarandus*). Vet. Rec. 148, 633-634
- LAI, L.-C., L. A. WAINWRIGHT, K. D. STONE und M. S. DONNENBERG (1997)
A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. Infect. Immun. 65, 2211-2217
- LAW, D. und H. CHART (1998)
A review – Enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Appl. Microbiol. 84, 685-697
- LEOTTA, G. A., E. S. MILIWEBSKY, I. CHINEN, E. M. ESPINOSA, K. AZZOPARDI, S. M. TENNANT, R. M. ROBINS-BROWNE und M. RIVAS (2008)
Characterisation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. BMC Microbiol. 8

- LEUNG, P. H. M., J. S. M. PEIRIS, W. W. S. NG, R. M. ROBINS-BROWNE, K. A. BETTELHEIM und W. C. YAM (2003)
A newly discovered verotoxin variant, VT 2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7549-7553
- LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A., A. PAAUW, A. T. A. BOX, H. E. M. BLOK, J. VERHOEF und A. C. FLUIT (2002)
Presence of Integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. J. Clin. Microbiol. 40, 3038-3040
- LEVINE, M. M. (1987)
Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohaemorrhagic and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155, 377-389
- LILLEHAUG, A., B. BERGSJØ, J. SCHAU, T. BRUHEIM, T. VIKØREN und K. HANDELAND (2005)
Campylobacter spp., *Salmonella* spp., verocytotoxic *Escherichia coli* and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. Acta. Vet. Scand. 46, 23-32
- LINGWOOD, C. A., H. LAW, S. RICHARDSON, M. PETRIC, J. L. BRUNTON, S. DE GRANDIS und M. KARMALI (1987)
Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. J. Biol. Chem. 262, 8834-8839
- LODE, H., R. STAHLMANN, M. KRESKEN und H. PRETORIUS (2006)
Wichtige Erreger in Klinik und Praxis – *Escherichia coli*. Zeitschrift für Chemotherapie – Informationen für Ärzte und Apotheker zur rationalen Infektionstherapie. <http://www.zct-berlin.de>
- LOPES, L. M., S. H. FABBRICOTTI, A. J. P. FERREIRA, M. A. M. F. KATO, J. MICHALSKI und I. C. A. SCALETSKY (2005)
Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. J. Clin. Microbiol. 43, 1968-1972
- MAC CONNACHIE, A. A. und W. T. A. TODD (2004)
Potential therapeutic agents for the prevention and treatment of haemolytic uraemic syndrome in shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Curr. Opin. Infect. Dis. 17, 479-482
- MAC DONALD, D. M., M. FYFE, A. PACCAGNELLA, A. TRINIDAD, K. LOUIE und D. PATRICK (2004)
Escherichia coli O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999. Epidemiol. Infect. 132, 283-289
- MADDEN, R. H., K. A. MURRAY und A. GILMOUR (2007)
Carriage of four bacterial pathogens by beef cattle in Northern Ireland at time of slaughter. Lett. Appl. Microbiol. 44, 115-119
- MAIDHOF, H., B. GUERRA, S. ABBAS, H. M. ELSHEIKHA, T. S. WHITTAM und L. BEUTIN (2002)
A multiresistant clone of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O118:[H16] is spread in cattle and humans over different European countries. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5834-584

- MAINIL, J. (1999)
Shiga/verocytotoxins and shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. Vet. Res. 30, 235-257
- MANNIX, M., D. WHYTE, E. MC NAMARA, N. O'CONNEL, R. FITZGERALD, M. MAHONY, T. PRENDIVILLE, T. NORRIS, A. CURTIN, A. CARROLL, E. WHELAN, J. BUCKLEY, J. MC CARTHY, M. MURPHY und T. GREALLY (2007)
Large outbreak of *E. coli* O157 in 2005, Ireland. Euro Surveill. 12, 54-56
- MARQUES, L. R. M., J. S. M. PEIRIS, S. J. CRYZ und A. D. O'BRIEN (1987)
Escherichia coli strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of shiga-like toxins II. FEMS Microbiol. Lett. 44, 33-38
- MARQUES, L. R. M., C. M. ABE, P. M. GRIFFIN und T. A. T. GOMES (1995)
Association between alpha-haemolysin production and HeLa cell-detaching activity in faecal isolates of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 33, 2707-2709
- MARQUES, L. R. M., A. T. TAVECHIO, C. M. ABE und T. A. T. GOMES (2003)
Search for cytolethal distending toxin production among faecal *Escherichia coli* isolates from Brazilian children with diarrhea and without diarrhea. J. Clin. Microbiol. 41, 2206-2208
- MARRE, R., I. SCHERINGER, A. ERB, H.-P. ZEITLER, T. STÜRMER und H. BRENNER (2002)
Prävalenz der *E. coli*-Antibiotikaresistenz in der Allgemeinbevölkerung. Bundesgesundhbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz 45, 130-137
- MC CARTHY, T. A., N. L. BARRETT, J. L. HADLER, B. SALSURY, R. T. HOWARD, D. W. DINGMAN, C. D. BRINKMAN, W. F. BIBB und M. L. CARTTER (2001)
Haemolytic uraemic syndrome and *Escherichia coli* O121 at a lake in Connecticut, 1999. Pediatr. 108, www.pediatrics.org/cgi/content/full/108/4/e59
- MC DANIEL, T. K., K. G. JARVIS, M. S. DONNENBERG und J. B. KAPER (1995)
A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 1664-1668
- MECSAS, J. und E. J. STRAUSS (1996)
Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands. Emerg. Infect. Dis. 2, 271-288
- MELLMANN, A., M. BIELASZEWSKA, L. B. ZIMMERHACKL, R. PRAGER, D. HARMSSEN, H. TSCHÄPE und H. KARCH (2005)
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: in vivo evolution of a bacterial pathogen. Clin. Infect. Dis. 41, 785-792
- MELTON-CELSA, A. R., J. E. ROGERS, C. K. SCHMITT, S. C. DARNELL und A. D. O'BRIEN (1998)
Virulence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in orally-infected mice correlates with the type of toxin produced by the infecting strain. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 51, 108-114

- MEYER, T., H. KARCH, J. HACKER, H. BOCKLAGE und J. HEESEMANN (1992)
Cloning and sequencing of a shiga-like toxin II-related gene from *Escherichia coli* O157:H7 strain 7279. Zentralbl. Bakteriол. 276, 176-188
- MILNES, A. S., I. STEWART, F. A. CLIFTON-HADLEY, R. H. DAVIES, D. G. NEWELL, A. R. SAYERS, T. CHEASTY, C. CASSAR, A. RIDLEY, A. J. C. COOK, S. J. EVANS, C. J. TEALE, R. P. SMITH, A. MC NALLY, M. TOSZEGHY, R. FUTTER, A. KAY und G. A. PAIBA (2008)
Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. Epidemiol. Infect. 136, 739-751
- MILON, A., E. OSWALD und J. DE RYCKE (1999)
Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. Vet. Res. 30, 203-219
- MØLLER NIELSEN, E., M. N. SKOV, J. J. MADSEN, J. LODAL, J. BRØCHNER JESPERSEN und D. L. BAGGESEN (2004)
Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6944-6947
- MOON, H. W., S. C. WHIPP, R. A. ARGENZIO, M. M. LEVINE und R. A. GIANNELLA (1983)
Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. Infect. Immun. 41, 1340-1351
- MORA, A., J. E. BLANCO, M. BLANCO, M. P. ALONSO, G. DHABI, A. ECHEITA, E. A. GONZÁLES, M. I. BERNÁRDEZ und J. BLANCO (2005)
Antimicrobial resistance of shiga toxin- (verotoxin-) producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. Res. Microbiol. 156, 793-806
- MORA, A., M. BLANCO, J. E. BLANCO, G. DAHBI, C. LÓPEZ, P. JUSTEL, M. P. ALONSO, A. ECHEITA, M. I. BERNÁRDEZ, E. A. GONZÁLES und J. BLANCO (2007a)
Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxin- (verocytotoxin-) producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. BMC Microbiol. 7
- MORA, A., S. L. LÉON, M. BLANCO, J. E. BLANCO, C. LÓPEZ, G. DAHBI, A. ECHEITA, E. A. GONZÁLES und J. BLANCO (2007b)
Phage types, virulence genes and PFGE profiles of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). Int. J. Food Microbiol. 114, 204-210
- MORABITO, S., G. DELL'OMO, U. AGRIMI, H. SCHMIDT, H. KARCH, T. CHEASTY und A. CAPRIOLI (2001)
Detection and characterisation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feral pigeons. Vet. Microbiol. 28, 275-283
- MUEHLHERR, J. E., C. ZWEIFEL, S. CORTI, J. E. BLANCO und R. STEPHAN (2003)
Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk tank milk in Switzerland. J. Dairy Sci. 86, 3849-3856

- MÜFFLING, VON T., M. SMAILOVIC, B. NOWAK, K. SAMMET, M. BÜLTE und G. KLEIN (2007)
Preliminary study of certain serotypes, genetic and antimicrobial resistance profiles of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) isolated in Bosnia and Germany from cattle or pigs and their products. *Int. J. Food Microbiol.* 117, 185-191
- MUKHERJEE, J., K. CHIOS, D. FISHWILD, D. HUDSON, S. O'DONNELL, S. M. RICH, A. DONOHUE-ROLFE und S. TZIPORI (2002a)
Human stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect. Immun.* 70, 612-619
- MUKHERJEE, J., K. CHIOS, D. FISHWILD, D. HUDSON, S. O'DONNELL, S. M. RICH, A. DONOHUE-ROLFE und S. TZIPORI (2002b)
Production and characterisation of protective human antibodies against shiga toxin 1. *Infect. Immun.* 70, 5896-5899
- MUNIESA, M., J. RECKTENWALD, M. BIELASZEWSKA, H. KARCH und H. SCHMIDT (2000)
Characterisation of shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect. Immun.* 68, 4850-4855
- MURAKAMI, J., K. KISHI, K. HIRAI, K. HIRAMATSU, T. YAMASAKI und M. NASU (2000)
Macrolides and clindamycin suppress the release of shiga-like toxins *Escherichia coli* O157:H7 in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents* 15, 103-109
- MURPHY, B. P., M. MURPHY, J. F. BUCKLEY, D. GILROY, M. T. ROWE, D. MC CLEERY und S. FANNING (2005)
In-line milk filter analysis: *Escherichia coli* O157 surveillance of milk production holdings. *Int. J. Hyg. Environ.-Health* 208, 407-413
- MURPHY, M., J. F. BUCKLEY, P. WHYTE, M. O'MAHONY, W. ANDERSON, P. G. WALL und S. FANNING (2007)
Surveillance of dairy production holdings supplying raw milk to the farmhouse cheese sector for *Escherichia coli* O157, O26 and O111. *J. Vet. Med.* 54, 358-365
- MURRAY, P. R., E. J. BARON, J. H. JORGENSEN, M. A. PFALLER und R. H. YOLKEN (2003)
Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington D.C., 8th Edition, Volume 1, 358
- MUTSCHLER, E., G. GEISSLINGER, H. K. KROEMER, P. RUTH und M. SCHÄFER-KORTING (2008)
Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 9. Auflage, 794-841
- NAGY, B. und P. Z. FEKETE (1999)
Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30, 259-284
- NATARO, J. P. und J. B. KAPER (1998)
Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142-201
- NATARO, J. P., T. STEINER und R. L. GUERRANT (1998)
Enteraggregative *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 251-261

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) (2002)

Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacterial isolated from animals; approved standard – second edition. NCCLS document M31-A2 (ISBN 1-56238-461-9). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) (2004)

Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacterial isolated from animals; informational supplement. NCCLS document M31-S1 (ISBN 1-56238-534-8). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) (2007)

Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. NCCLS document M100-S17 (ISBN 1-56238-625-5). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA

NERI, P., S. I. NAGANO, S.-I. YOKOYAMA, H. DOHI, K. KOBAYASHI, T. MIURA, T. INAZU, T. SUGIYAMA, Y. NISHIDA und H. MORI (2007)

Neutralizing activity of polyvalent Gb₃, Gb₂ and galacto-trehalose models against shiga toxins. *Microbiol. Immunol.* 51, 581-592

NISHIKAWA, K., K. MATSUOKA, E. KITA, N. OKABE, M. MIZUGUCHI, K. HINO, S. MIYAZAWA, C. YAMASAKI, J. AOKI, S. TAKASHIMA, Y. YAMAKAWA, M. NISHIJIMA, D. TERUNUMA, H. KUZUHARA und Y. NATORI (2002)

A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *PNAS* 99, 7669-7674

O'BRIEN, A. D. und R. K. HOLMES (1987)

Shiga and shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51, 206-220

O'BRIEN, A. D. und G. D. LA VECK (1983)

Purification and characterisation of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40, 675-683

O'BRIEN, A. D., M. R. THOMPSON, J. R. CANTEY und S. B. FORMAL (1977)

Production of a *Shigella dysenteriae*-like toxin by pathogenic *Escherichia coli*. Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. B-103, p.32. zitiert in: Bülte M. und M. Goll (2006). Pathogene Mikroorganismen – *Escherichia coli* und Shigellen. Behr's Verlag, 1. Auflage

OHARA, M., E. OSWALD und M. SUGAI (2004)

Cytolethal distending toxin: a bacterial bullet targeted to nucleus. *J. Biochem.* 136, 409-413

OHMURA-HOSHINO, M., S.-T. HO, H. KURAZONO, K. IGARASHI, S. YAMASAKI und Y. TAKEDA (2003)

Genetic and immunological analysis of a novel variant of shiga toxin 1 from bovine *Escherichia coli* strains and development of bead-ELISA to detect the variant toxin. *Microbiol. Immunol.* 47, 717-725

- OKEKE, I. N., H. STEINRÜCK, K. J. KANACK, S. J. ELLIOTT, L. SUNDSTRÖM, J. B. KAPER und A. LAMIKANRA (2002)
Antibiotic-resistant cell-detaching *Escherichia coli* strains from Nigerian children. J. Clin. Microbiol. 40, 301-305
- ORDEN, J. A., J. A. RUIZ-SANTA-QUITERIA, D. CID, S. GARCÍA und R. DE LA FUENTE (1999)
Prevalence and characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* (NTEC) strains isolated from diarrhoeic dairy calves. Vet. Microbiol. 66, 265-273
- ORDEN, J. A., D. CID, J. A. RUIZ-SANTA-QUITERIA, S. GARCÍA, S. MARTINEZ und R. DE LA FUENTE (2002)
Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. J. Appl. Microbiol. 93, 29-35
- ORR, P., B. LORENCZ, R. BROWN, R. KIELLY, B. TAN, D. HOLTON, H. CLUGSTONE, L. LUGTIG, C. PIM, S. MAC DONALD et al. (1994)
An outbreak of diarrhea due to verotoxin-producing *Escherichia coli* in the Canadian Northwest Territories. Scand. J. Infect. Dis. 26, 675-684
- ØRSKOV, F. und I. ØRSKOV (1984)
Serotyping of *Escherichia coli*. In: Bergan, T. (Hrsg.): Methods in Microbiol. 15, Academic Press, London, 43-112
- OSTROFF, S. M., P. I. TARR, M. A. NEILL, J. H. LEWIS, N. HARGRETT-BEAN und J. M. KOBAYASHI (1989)
Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. J. Infect. Dis. 160, 994-998
- OSTROFF, S. M., P. M. GRIFFIN, R. V. TAUXE, L. D. SHIPMAN, K. D. GREENE, J. G. WELLS, J. H. LEWIS, P. A. BLAKE und J. M. KOBAYASHI (1990)
A statewide outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in Washington state. Am. J. Epidemiol. 132, 239-247
- OSWALD, E., J. DE RYCKE, P. LINTERMANS, K. VAN MUYLEM, J. MAINIL, G. DAUBE und P. POHL (1991)
Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type two in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 29, 2522-2527
- OTEO, J., J. CAMPOS, F. BAQUERO und Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) (2002)
Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2001). J. Antimicrob. Chemother. 50, 945-952
- PANETO, B. R., R. P. SCHOCKEN-ITURRINO, C. MACEDO, E. SANTO und J. M. MARIN (2007)
Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59, 508-512

- PANOS, G. Z., G. I. BETSI und M. E. FALAGAS (2006)
Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24, 731-742
- PATON, J. C. und A. W. PATON (1998)
Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479
- PATON, A. W., L. BEUTIN und J. C. PATON (1995)
Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* shiga-like toxin type-I operon. *Gene* 153, 71-74
- PATON, A. W., M. C. WOODROW, R. M. DOYLE, J. A. LANSER und J. C. PATON (1999)
Molecular characterisation of a shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of haemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3357-3361
- PATON, A. W., R. MORONA und J. C. PATON (2000)
A new biological agent for treatment of shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nat. Med.* 6, 265-270
- PAYNE, C. J. I., M. PETROVIC, R. J. ROBERTS, A. PAUL, E. LINNANE, M. WALKER, D. KIRBY, A. BURGESS, R. M. M. SMITH, T. CHEASTY, G. WILLSHAW und R. L. SALMON (2003)
Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 gastroenteritis in farm visitors, North Wales. *CDC* 9, www.cdc.gov
- PEBODY, R. G., C. FURTADO, A. ROJAS, N. MC CARTHY, G. NYLEN, P. RUUTU, T. LEINO, R. CHALMERS, B. DE JONG, M. DONNELLY, I. FISHER, C. GILHAM, L. GRAVERSON, T. CHEASTY, G. WILLSHAW, M. NAVARRO, R. SALMON, P. LEINIKKI, P. WALL und C. BARTLETT (1999)
An international outbreak of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiol. Infect.* 123, 217-223
- PERNA, N. T., G. F. MAYHEW, G. PÓSFAL, S. ELLIOTT, M. S. DONNENBERG, J. B. KAPER und F. R. BLATTNER (1998)
Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 66, 3810-3817
- PHAC (Public Health Agency of Canada) (2000)
Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario, May-June 2000. *CCDR* 26, www.phac-aspc.gc.ca
- PIÉRARD, D., G. MUYLDERMANS, L. MORIAU, D. STEVENS und S. LAUWERS (1998)
Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3317-3322
- PINYON, R. A., J. C. PATON, A. W. PATON, J. A. BOTTEN und R. MORONA (2004)
Refinement of a therapeutic shiga toxin-binding probiotic for human trials. *J. Infect. Dis.* 189, 1547-1555

- POLLOCK, K. G. J., T. J. BEATTIE, B. REYNOLDS, A. STEWART und J. M. COWDEN (2007)
Clinical management of children with suspected or confirmed *E. coli* O157 infection. *Scot. Med. J.* 52, 5-7
- PRADEL, N., V. LIVRELLI, C. DE CHAMPS, J.-B. PALCOUX, A. REYNAUD, F. SCHEUTZ, J. SIROT, B. JOLY und C. FORESTIER (2000)
Prevalence and characterisation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1023-1031
- PROULX, F., J. P. TURGEON, G. DELAGE, L. LAFLEUR und L. CHICOINE (1992)
Clinical and laboratory observations – Randomized, controlled trial of antibiotic therapy for *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. *J. Pediatr.* 121, 299-303
- QUINTO, E. J. und A. CEPEDA (1996)
Presence of CNF-producing *Escherichia coli* strains in soft cheese. *Arch. Lebensmittelhyg.* 47, 81-104
- RABATSKY-EHR, T., D. DINGMAN, R. MARCUS, R. HOWARD, A. KINNEY und P. MSHAR (2002)
Deer meat as the source for a sporadic case of *Escherichia coli* O157:H7 infection, Connecticut. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 525-527
- RÅDSTRÖM, P., G. SWEDBERG und O. SKÖLD (1991)
Genetic analyses of sulphonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R Plasmid evolution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1840-1848
- RAMACHANDRAN, V., M. A. HORNITZKY, K. A. BETTELHEIM, M. J. WALKER und S. P. DJORDJEVIC (2001)
The common ovine shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a *stx2d* toxin type. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1932-1937
- RASMUSSEN, M. A., W. C. CRAY, T. A. CASEY und S. C. WHIPP (1993)
Rumen contents as a reservoir of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 114, 79-84
- REIDA, P., M. WOLFF, H. W. PÖHLS, W. KUHLMANN, A. LEHMACHER, S. ALEKSIĆ, H. KARCH und J. BOCKEMÜHL (1994)
An outbreak due to enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a children day care centre characterized by person-to-person transmission and environmental contamination. *Zentralbl. Bakteriol.* 281, 534-543
- RENTER, D. G., J. M. SARGEANT, S. E. HYGNSTORM, J. D. HOFFMAN und J. R. GILLESPIE (2001)
Escherichia coli O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska. *J. Wildlife Dis.* 37, 755-760
- RICE, D. H. und D. D. HANCOCK (1995)
Verotoxigenic *E. coli* O157 colonisation of wild deer and range cattle. *Vet. Rec.* 137, 524

- RICE, D. H., E. D. EBEL, D. D. HANCOCK, T. E. BESSER, D. E. HERRIOTT und L. V. CARPENTER (1997)
Escherichia coli O157 in cull dairy cows on farms and at slaughter. J. Food Prot. 60, 1386-1387
- RICHTER, H., H. KLIE, M. TIMM, P. GALLIEN, H. STEINRÜCK, K.-W. PERLBERG und D. PROTZ (1997)
Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) im Kot von Schlachtrindern aus Deutschland. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 110, 121-127
- RICHTER, H., H. KLIE, M. TIMM, P. GALLIEN, K.-W. PERLBERG, P. TEUFEL, D. PROTZ und H. STEINRÜCK (1998)
Verotoxin-bildende *Escherichia coli* (VTEC) in Milch, Fleisch, Wurst von Rindern als potentielle enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). Robert Koch Institut, Info 2, 3-6
- RILEY, L. W., R. S. REMIS, S. D. HELGERSON, H. B. MC GEE, J. G. WELLS, B. R. DAVIS, R. J. HEBERT, E. S. OLCOTT, L. M. JOHNSON, N. T. HARGRETT, P. A. BLAKE und M. L. COHEN (1983)
Haemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308, 681-685
- RKI (Robert Koch-Institut) (1996a)
Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten – Übersicht: Die Pathovare von *Escherichia coli* beim Menschen. Epid. Bull. 30, 205-206
- RKI (Robert Koch-Institut) (1996b)
Von Tieren ausgeschiedene verotoxinogene *Escherichia coli*: ein Potential enterohämorrhagischer *E. coli* für den Menschen. Epid. Bull. 38, 259-260
- RKI (Robert Koch-Institut) (2002)
Zur Situation bei wichtigen Infektionskrankheiten: Bakterielle Gastroenteritiden in Deutschland 2001. Epid. Bull. 50, 417-422
- RKI (Robert Koch-Institut) (2004)
Risikofaktoren für sporadische STEC (EHEC)–Erkrankungen – Ergebnisse einer bundesweiten Fall-Kontroll-Studie. Epid. Bull. 50, 433-436
- RKI (Robert Koch-Institut) (2005)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005.
<http://www.rki.de>
- RKI (Robert Koch-Institut) (2006)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2005.
<http://www.rki.de>
- RKI (Robert Koch-Institut) (2007a)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2006.
<http://www.rki.de>

- RKI (Robert Koch-Institut) (2007b)
Zur Surveillance der Antibiotikaresistenz in Deutschland. *Epid. Bull.* 44, 405-409
- RKI (Robert Koch-Institut) (2008a)
RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte – Erkrankungen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC). *Epid. Bull.* 2, 11-15
- RKI (Robert Koch-Institut) (2008b)
Zum Auftreten mehrerer EHEC-Infektionen nach Rohmilchverzehr in einem Ferienlager. *Epid. Bull.* 2, 16-18
- RKI (Robert Koch-Institut) (2008c)
Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2007.
<http://www.rki.de>
- RKI (Robert Koch-Institut) und BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) (2001)
EHEC-Infektionen – Erkennung, Verhütung und Bekämpfung. *Bundesgesundhbl.* 44, 1146-1148
- ROLLE, M. und A. MAYR (1993)
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke-Verlag, Stuttgart, 6. Auflage, 579-593
- ROLLE, M. und A. MAYR (2002)
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke-Verlag, Stuttgart, 7. Auflage, 403-404, 451-469
- SACHS, L. (1997)
Angewandte Statistik. 7. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Kap. 62ff.
- SAFDAR, N., A. SAID, R. E. GANGNON und D. G. MAKI (2002)
Risk of haemolytic uraemic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis. *JAMA*, 288, 996-1001
- SAMADPOUR, M., M. KUBLER, F. C. BUCK, G. A. DEPAVIA, E. MAZENGA, J. STEWART, P. YANG und D. ALFI (2002)
Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and cattle faeces from King County, Washington. *J. Food Prot.* 65, 1322-1325
- SANCAK, A. A., H. C. RUTGERS, C. A. HART und R. M. BATT (2004)
Prevalence of enteropathogenic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhea. *Vet. Rec.* 154, 101-106
- SANG, W. K., J. O. OUNDO, J. K. MWITURIA, P. G. WAIYAKI, M. YOH, T. IIDA und T. HONDA (1997)
Multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in Kenyan children. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 373-374

- SARTZ, L., B. DE JONG, M. HJERTQVIST, L. PLYM-FORSHELL, R. ALSTERLUND, S. LÖFDAHL, B. OSTERMAN, A. STÅHL, E. ERIKSSON, H.-B. HANSSON und D. KARPMAN (2008)
An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiol. Infect.* 136, 370-380
- SAVARINO, S. J., A. FASANO, J. WATSON, B. M. MARTIN, M. M. LEVINE, S. GUANDALINI und P. GUERRY (1993)
Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 3093-3097
- SAVARINO, S. J., A. MC VEIGH, J. WATSON, A. CRAVIOTO, J. MOLINA, P. ECHEVERRIA, M. K. BHAN, M. M. LEVINE und A. FASANO (1996)
Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable Enterotoxin is not restricted to enterotoxigenic *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 173, 1019-1022
- SAWAMURA, S., K. TANAKA und Y. KOGA (1999)
Therapeutic effects of antibiotics against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 infection: in vivo analysis using germfree mice. *Kansenshogaku Zasshi* 73, 1054-1063
- SCHIMMER, B., H. M. ERIKSEN, K. NYGÅRD, D. GRAHEK-OGDEN, T. MADSEN, A. HAJDU, Ø. LØVOLL, T. L. STAVNES, J. LASSEN, G. KAPPERUD und P. AAVITSLAND (2006)
An outbreak of haemolytic uraemic syndrome associated with minced beef, Norway, January-February 2006: preliminary report. *Euro Surveill.* 11, www.eurosurveillance.org
- SCHIMMER, B., K. NYGARD, H. M. ERIKSEN, J. LASSEN, B. A. LINDSTEDT, L. T. BRANDAL, G. KAPPERUD und P. AVITSLAND (2008)
Outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Norway caused by *stx2a*-positive *Escherichia coli* O103:H25 traced to cured mutton sausage. *BMC Infect. Dis.* 8
- SCHMIDT, H. und H. KARCH (1996)
Enterohaemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and haemolytic uraemic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2364-2367
- SCHMIDT, H., L. BEUTIN und H. KARCH (1995)
Molecular analysis of the plasmid-encoded haemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63, 1055-1061
- SCHMIDT, H., J. VON MELDEGHEM, M. FROSCHE und H. KARCH (1998)
Antibiotic susceptibilities of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains isolated from patients and healthy subjects in Germany during 1996. *J. Antimicrob. Chemother.* 42, 548-550
- SCHMIDT, H., J. SCHEEF, S. MORABITO, A. CAPRIOLI, L. H. WIELER und H. KARCH (2000)
A new shiga toxin 2 variant (*stx2f*) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1205-1208

- SCHMIDT, H., W.-L. ZHANG, U. HEMMRICH, S. JELACIC, W. BRUNDER, P. I. TARR, U. DOBRINDT, J. HACKER und H. KARCH (2001)
Identification and characterisation of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69, 6863-6873
- SCHMITT, C. K., M. L. MC KEE und A. D. O'BRIEN (1991)
Two copies of shiga-like toxin II-related genes common in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenetic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect. Immun.* 59, 1065-1073
- SCHÖNENBRÜCHER, H. (2006)
Untersuchungen zur Typisierung des *eae*-Gens enterohämorrhagischer und enteropathogener *Escherichia coli*. Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen
- SCHOLZ, H., F. VOGEL, M. ABELE-HORN, D. ADAM, B. H. BELOHRADSKY, W. HANDRICK, U. HEININGER, H. LUCKHAUPT, R. NOACK und R. ROOS (2002)
Rationaler Einsatz oraler Antibiotika bei Kindern und Jugendlichen – Empfehlungen einer Expertenkommission der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. *Chemother. J.* 2, 59-70
- SCHOUTEN, J. M., E. A. M. GRAAT, K. FRANKENA, F. VAN ZIJDERVELD und M. C. M. DE JONG (2008)
Transmission and quantification of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in dairy cattle and calves.
<http://journals.cambridge.org/download.php?file=%2FHYG%2FS0950268808000320a.pdf&code=b76c98144e7fd8c1b5d589f01343f27c>
- SCHROEDER, C. M., J. MENG, S. ZHAO, C. DEBROY, J. TORCOLINI, C. ZHAO, P. F. MC DERMOTT, D. D. WAGNER, R. D. WALKER und D. G. WHITE (2002a)
Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128 and O145 from animals and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1409-1414
- SCHROEDER, C. M., C. ZHAO, C. DEBROY, J. TORCOLINI, S. ZHAO, D. G. WHITE, D. D. WAGNER, P. F. MC DERMOTT, R. D. WALKER und J. MENG (2002b)
Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine and food. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 576-581
- SCHWARZ, S. und E. CHASLUS-DANCLA (2001)
Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.* 32, 201-225
- SCHWARZ, S. und C. KEHRENBURG (2000)
Antimikrobielle Resistenz: Resistenzmechanismen, Resistenzgene und Übertragungswege. *Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr.* 7, 55-60

- SCHWARZ, S., A. BÖTTNER, H. M. HAFEZ, C. KEHRENBURG, M. KIETZMANN, D. KLARMANN, G. KLEIN, P. KRABISCH, T. KÜHN, G. LUHOFER, A. RICHTER, W. TRAEDER, K.-H. WALDMANN, J. WALLMANN und C. WERCKENTHIN (2003)
Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur in-vitro Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung im Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 116, 353-361
- SCOTLAND, S. M., H. R. SMITH und B. ROWE (1985)
Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157. Lancet. 2, 885-886
- SHEORAN, A. S., S. CHAPMAN, P. SINGH, A. DONOHUE-ROLFE und S. TZIPORI (2003)
Stx2-specific human monoclonal antibodies protect mice against lethal infection with *Escherichia coli* expressing *stx2* variants. Infect. Immun. 71, 3125-3130
- SHERE, J. A., K. J. BARTLETT und C. W. KASPAR (1998)
Longitudinal study of *Escherichia coli* O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1390-1399
- SHIOMI, M., M. TOGAWA, K. FUJITA und R. MURATA (1999)
Effect of early oral fluoroquinolones in haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7. Pediatr. Int. 41, 228-232
- SINGH, R., C. M. SCHROEDER, J. MENG, D. G. WHITE, P. F. MCDERMOTT, D. D. WAGNER, H. YANG, S. SIMJEE, C. DEBROY, R. D. WALKER und S. ZHAO (2005)
Identification of antimicrobial resistance and class 1 integrons in shiga toxin-producing *Escherichia coli* recovered from humans and food animals. J. Antimicrob. Chemother. 56, 216-219
- SIXMA, T. K., K. H. KALK, B. A. VAN ZANTEN, Z. DAUTER, J. KINGMA, B. WITHOLT und W. G. HOL (1993)
Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. J. Mol. Biol. 230, 890-918
- SLUTSKER, L., A. A. RIES, K. MALONEY, J. G. WELLS, K. D. GREENE, P. M. GRIFFIN and the *Escherichia coli* study group (1998)
A nationwide case-control study of *Escherichia coli* O157:H7 infection in the United States. J. Infect. Dis. 177, 962-966
- SMITH, K. A., S. KRUTH, J. HAMMERMUELLER, C. GYLES und J. B. WILSON (1998)
A case-control study of verocytotoxigenic *Escherichia coli* infections in cats with diarrhea. Can. J. Vet. Res. 62, 87-92
- SNARY, E. L., L. A. KELLY, H. C. DAVISON, C. J. TEALE und M. WOOLDRIDGE (2004)
Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective. J. Antimicrob. Chemother. 53, 906-917
- SÖDERSTRÖM, A., A. LINDBERG und Y. ANDERSSON (2005)
EHEC O157 outbreak in Sweden from locally produced lettuce, August-September 2005. Euro Surveill. 10, www.eurosurveillance.org

- STEPHAN, R. und L. E. HOELZLE (2000)
Characterisation of shiga toxin type 2 variant B-subunit in *Escherichia coli* strains from asymptomatic carriers by PCR-RFLP. Lett. Appl. Microbiol. 31, 139-142
- STEPHAN, R. und K. KÜHN (1999)
Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in bovine coli mastitis and their antibiotic resistance patterns. J. Vet. Med. B. 46, 423-427
- STEPHAN, R. und S. SCHUMACHER (2001)
Resistance patterns of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. Lett. Appl. Microbiol. 32, 114-117
- STEPHAN, R., S. RAGETTLI und F. UNTERMANN (2000)
Occurrence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in faecal swabs from slaughter cattle and sheep – an observation from a meat hygiene view. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 142, 110-114
- STOCK, I., K. MACHKA, A. RODLOFF und B. WIEDEMANN (2001)
Qualitätssicherung und Qualitätskontrollen in der Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung von Bakterien mit der Mikrodilution. Chemother. J. 3, 78-98
- STROCKBINE, N. A., L. R. M. MARQUES, J. W. NEWLAND, H. W. SMITH, R. K. HOLMES und A. D. O'BRIEN (1986)
Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. Infect. Immun. 53, 135-140
- STROCKBINE, N. A., M. P. JACKSON, L. M. SUNG, R. K. HOLMES und A. D. O'BRIEN (1988)
Cloning and sequencing of the genes for shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. J. Bact. 170, 1116-1122
- STROH, K. (2002)
Fachinformation "Umwelt und Gesundheit" – Antibiotika und Antibiotikaresistenzen in Lebensmitteln und Umwelt. Umweltberatung Bayern.
http://www.lfu.bayern.de/umweltwissen/schadstoffe/doc/stoffbeschreibungen/02_antibiotika.pdf
- SUZUKI, M., F. KONDO, Y. ITOA, M. MATSUMOTO, M. HATA, H. OKA, M. TAKAHASHI und K. SAKAE (2004)
Identification of a shiga toxin type I variant containing an IS1203-like element, from shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7. FEMS Microbiol. Lett. 234, 63-67
- TAKAHASHI, K., K. NARITA, Y. KATO, T. SUGIYAMA, N. KOIDE, T. YOSHIDA und T. YOKOCHI (1997)
Low-level release of shiga-like toxin (verocytotoxin) and endotoxin from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* treated with imipenem. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 2295-2296

- TAKEDA, T., M. TANIMURA, K. YOSHINO, E. MATSUDA, H. UCHIDA und N. IKEDA (1997)
Early use of antibiotics for STEC O157:H7 infection reduces the risk of haemolytic uraemic syndrome. Presented at the 3rd International Symposium and Workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Infections. Melville, NY: Lois Joy Galler Foundation for Haemolytic Uraemic Syndrome. zitiert in AHMED, A. M., H. KAWAMOTO, K. INOUE, Y. HASHIWATA, M. SAKAKI, M. SENO und T. SHIMAMOTO (2005). Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 causing a family outbreak in Japan. J. Med. Microbiol. 54, 867-872
- TARR, P. I., T. E. BESSER, D. D. HANCOCK, W. E. KEENE und M. GOLDOFT (1997)
Verotoxigenic *Escherichia coli* infection: U.S. overview. J. Food Prot. 60, 1466-1471
- TARR, P. I., C. A. GORDON und W. L. CHANDLER (2005)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet 365, 1073-1086
- TEUBER, M. (1999)
Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. Cell. Mol. Life Sci. 56, 755-763
- THOMS, B. (1999)
Nachweis von Verotoxin-bildenden *Escherichia coli* in Rehfleisch. Arch. Lebensmitt. Hyg. 50, 52-54
- THORPE, C. M. (2004)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. Clin. Infect. Dis. 38, 1298-1303
- TKALCIC, S., C. A. BROWN, B. G. HARMON, A. V. JAIN, E. P. O. MUELLER, A. PARKS, K. L. JACOBSEN, S. A. MARTIN, T. ZHAO und M. P. DOYLE (2000)
Effects of rumen proliferation and faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. J. Food Prot. 63, 1630-1636
- TODD, W. T. und S. DUNDAS (2001)
The management of VTEC O157 infection. Int. J. Food Microbiol. 66, 103-110
- TRABULSI, L. R., R. KELLER und T. A. T. GOMES (2002)
Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg. Infect. Dis. 8, 508-513
- TRACHTMAN, H., A. CNAAN, E. CHRISTEN, K. GIBBS, S. ZHAO, D. W. K. ACHESON, R. WEISS, F. J. KASKEL, A. SPITZER und G. H. HIRSCHMAN (2003)
Effect of an oral shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated haemolytic uraemic syndrome in children. JAMA 290, 1337-1344
- TZIPORI, S., H. KARCH, K. I. WACHSMUTH, R. M. ROBINS-BROWNE, A. D. O'BRIEN, H. LIOR, M. L. COHEN, J. SMITHERS und M. M. LEVINE (1987)
Role of a 60-megadalton plasmid and shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. Infect. Immun. 55, 3117-3125

- VARELA-HERNÁNDEZ, J. J., E. CABRERA-DIAZ, M. A. CARDONA-LÓPEZ, L. M. IBARRA-VELÁZQUEZ, H. RANGEL-VILLALOBOS, A. CASTILLO, M. R. TORRES-VITELA und A. RAMÍREZ-ÁLVAREZ (2007)
Isolation and characterisation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 237-241
- VARMA, J. K., K. D. GREENE, M. E. RELLER, S. M. DELONG, J. TROTTIER, S. F. NOWICKI, M. DIORIO, E. M. KOCH, T. L. BANNERMAN, S. T. YORK, M.-A. LAMBERT-FAIR, J. G. WELLS und P. S. MEAD (2003)
An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA* 290, 2709-2712
- VERWEYEN, H. M., H. KARCH, F. ALLERBERGER und L. B. ZIMMERHACKL (1999)
Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in pediatric haemolytic uraemic syndrome: a prospective study in Germany and Austria. *Infection* 27, 341-347
- VIVEGNIS, J., M. EL LIOUI, A. LECLERCQ, B. LAMBERT und J. DECALLONNE (1999)
Detection of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* from raw milk cheeses produced in Wallonia. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 3, 159-164
- WADDELL, T., S. HEAD, M. PETRIC, A. COHEN und C. LINGWOOD (1988)
Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the *Escherichia coli* verocytotoxin 2. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 152, 674-679
- WAHLSTRÖM, H., E. TYSÉN, E. OLSSON ENGVALL, B. BRÄNDSTRÖM, E. ERIKSSON, T. MÖRNER und I. VÅGSHOLM (2003)
Survey of *Campylobacter* species, VTEC O157 and *Salmonella* species in Swedish wildlife. *Vet. Rec.* 153, 74-80
- WALLACE, J. S., T. CHEASTY und K. JONES (1997)
Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *J. Appl. Microbiol.* 82, 399-404
- WALLMANN, J. (1999)
Antibakterielle Chemotherapie unter dem Aspekt der Antibiotikaresistenz. *Bundesgesundhbl.* 42, 58-61
- WALSH, C., G. DUFFY, R. O'MAHONY, S. FANNING, I. S. BLAIR und D. A. MC DOWELL (2006)
Antimicrobial resistance in Irish isolates of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (*E. coli*) – VTEC. *Int. J. Food Microbiol.* 109, 173-178
- WANG, G., T. ZHAO und M. P. DOYLE (1996)
Fate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine faeces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2567-2570
- WANI, S. A., M. A. BHAT, I. SAMANTA, Y. NISHIKAWA und A. S. BUCH (2003)
Isolation and characterisation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhea in India. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 121-126

- WANI, S. A., I. SAMANTA, M. A. BHAT und Y. NISHIKAWA (2004)
Investigation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in avian species in India. Appl. Microbiol. Lett. 39, 389-394
- WASTESON, Y., J. M. ARNEMO, B. KLUNGSETH JOHANSEN, L. VOLD, S. D. MATHIESEN, M. A. OLSEN, Ø. WIIG und A. E. DEROCHE (1999)
Analysis of faecal samples from wild animals for verocytotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157. Vet. Rec. 144, 646-647
- WATANABE, M., K. MATSUOKA, E. KITA, K. IGAI, N. HIGASHI, A. MIYAGAWA, T. WATANABE, R. YANOSHITA, Y. SAMEJIMA, D. TERUNUMA, Y. NATORI und K. NISHIKAWA (2004)
Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of shiga toxigenic *Escherichia coli* infections. J. Infect. Dis. 189, 360-368
- WEINSTEIN, D. L., M. P. JACKSON, J. E. SAMUEL, R. K. HOLMES und A. D. O'BRIEN (1988)
Cloning and sequencing of a shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. J. Bact. 170, 4223-4230
- WEINTRAUB, A. (2007)
Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. J. Med. Microbiol. 56, 4-8
- WELLS, J. G., B. R. DAVIS, I. K. WACHSMUTH, L. W. RILEY, R. S. REMIS, R. SOKOLOW und G. K. MORRIS (1983)
Laboratory investigation of haemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. J. Clin. Microbiol. 18, 512-520
- WERBER, D., S. C. BEHNKE, A. FRUTH, R. MERLE, S. MENZLER, S. GLASER, L. KREIENBROCK, R. PRAGER, H. TSCHÄPE, P. ROGGENTIN, J. BOCKEMÜHL und A. AMMON (2007)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Germany – different risk factors for different age groups. Am. J. Epidemiol. 165, 425-434
- WERNER, G. und S. BRONZWAER (2007)
Ensuring prudent use of antimicrobials in human medicine in the European Union, 2005. Euro Surveill. 12, 64-67
- WHITE, D. G., S. ZHAO, S. SIMJEE, D. D. WAGNER und P. F. McDERMOTT (2002)
Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microb. Infect. 4, 405-412
- WHO (World Health Organization) (1991)
Report of WHO consultation on “shiga-like toxins” producing *Escherichia coli*, with special emphasis on zoonotic aspects. Gießen, 10.-12. Dezember 1991. WHO/CDS/VPH/92.103
- WIELER, L. H., R. BAUERFEIND und G. BALJER (1992)
Characterisation of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* (SLTEC) isolated from calves with and without diarrhea. Zbl. Bakt. 276, 243-253

- WILLIAMS, R. C., S. ISAACS, M. L. DECOU, E. A. RICHARDSON, M. C. BUFFETT, R. W. SLINGER, M. H. BRODSKY, B. W. CIEBIN, A. ELLIS, J. HOCKIN and the *E. coli* working group (2000)
Illness outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami. *CMAJ* 162, 1409-1413
- WILLSHAW, G. A., T. CHEASTY, H. R. SMITH, S. J. O'BRIEN und G. K. ADAK (2001)
Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 and other VTEC from human infections in England and Wales: 1995-1998. *J. Med. Microbiol.* 50, 135-142
- WITTE, W., I. KLARE und G. WERNER (1999)
Einsatz von Antibiotika als Leistungsförderer in der Tiermast und Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern des Menschen. *Fleischwirtsch.* 4, 90-94
- WITTE, W., B. STROMMINGER, I. KLARE und G. WERNER (2004)
Bakterielle Erreger von Krankenhausinfektionen mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen. Teil I: Diagnostik und Typisierung. *Bundesgesundhbl.* 47, 352-362
- WONG, C. S., S. JELACIC, R. L. HABEEB, S. L. WATKINS und P. I. TARR (2000)
The risk of the haemolytic uraemic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N. Engl. J. Med.* 342, 1930-1936
- WOODWARD, D. L., C. G. CLARK, R. A. CALDEIRA, R. AHMED und F. G. RODGERS (2002)
Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC): A major public health threat in Canada. *Can. J. Infect. Dis.* 13, 321-330
- YOH, M., E. K. FRIMPONG, S. P. VORAVUTHIKUNCHAI und T. HONDA (1999)
Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Can. J. Microbiol.* 45, 732-739
- YOSHIMURA, K., J. FUJII, H. TANIGUCHI und S.-I. YOSHIDA (1999)
Chemotherapy for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in a mouse model. *FEMS Immun. Med. Microb.* 26, 101-108
- ZHANG, W., M. BIELASZEWSKA, T. KUCZIUS und H. KARCH (2002)
Identification, characterisation and distribution of a shiga toxin 1 gene variant (*stx_{1c}*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1441-1446
- ZHANG, X., A. D. MC DANIEL, L. E. WOLF, G. T. KEUSCH, M. K. WALDOR und D. W. K. ACHESON (2000)
Quinolone antibiotics induce shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production and death in mice. *J. Infect. Dis.* 181, 664-670
- ZHAO, S., D. G. WHITE, B. GE, S. AYERS, S. FRIEDMAN, L. ENGLISH, D. WAGNER, S. GAINES und J. MENG (2001)
Identification and characterisation of integron-mediated antibiotic resistance among shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1558-1564

- ZHOU, Z., Y. NISHIKAWA, P. ZHU, S. HONG, A. HASE, T. CHEASTY, H. R. SMITH, M. ZHENG und K. HARUKI (2002)
Isolation and characterisation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from beef, pork and cattle faecal samples in Changchun, China. J. Vet. Med. Sci. 64, 1041-1044
- ZIMMERHACKL, L. B. (2000)
E. coli, antibiotics and the haemolytic uraemic syndrome. N. Engl. J. Med. 342, 1990-1991
- ZSCHÖK, M., A. A. AMR EL. SAYED und H.-P. HAMANN (1998)
Zum Vorkommen Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) bei der Mastitis des Rindes. Milchwiss. 53, 307-309
- ANONYMOUS (2000)
Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz – IfSG), zuletzt geändert am 13.12.2007. <http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/ifsg/gesamt.pdf>
- ANONYMOUS (2005)
Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.
http://www.tirol.gv.at/fileadmin/www.tirol.gv.at/themen/gesundheit/veterinaer/downloads/gesetze/VO_EG_2073_2005_08.02.2007.pdf
- ANONYMOUS (2007)
Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 der Kommission vom 5. Dezember 2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.
http://www.bmelv.de/nr_856562/SharedDocs/downloads/02Verbraucherschutz/Lebensmittelsicherheit/LebensmittelhygieneVerordnungen/VO_1441_2007_templateId=raw,property=publicationFile.pdf/VO_1441_2007.pdf

10. Anhang

10.1 Ergebnisse zur Einstellung der Keimdichte

Tabelle 47: Ergebnisse zur Erfassung der Keimdichte der VTEC-Stämme

Stamm	optische Dichte bei 625 nm	Durchschnittliche Bakteriendichte (KbE/ml)
1	0,083	$8,3 \times 10^7$
1	0,083	$8,3 \times 10^7$
1	0,081	$6,1 \times 10^7$
2	0,080	$6,7 \times 10^7$
2	0,085	$8,1 \times 10^7$
2	0,079	$9,7 \times 10^7$
3	0,085	$7,4 \times 10^7$
3	0,083	$8,0 \times 10^7$
3	0,081	$5,7 \times 10^7$
1	0,103	$1,5 \times 10^8$
1	0,102	$1,3 \times 10^8$
1	0,100	$1,6 \times 10^8$
2	0,102	$9,8 \times 10^7$
2	0,099	$1,4 \times 10^8$
2	0,100	$1,7 \times 10^8$
3	0,105	$1,9 \times 10^8$
3	0,103	$1,4 \times 10^8$
3	0,097	$1,5 \times 10^8$
1	0,150	$2,3 \times 10^8$
1	0,155	$1,8 \times 10^8$
1	0,150	$1,3 \times 10^8$
2	0,155	$1,9 \times 10^8$
2	0,153	$2,1 \times 10^8$
2	0,149	$1,4 \times 10^8$
3	0,152	$1,6 \times 10^8$
3	0,151	$1,8 \times 10^8$
3	0,151	$1,7 \times 10^8$
1	0,200	$2,9 \times 10^8$
1	0,197	$1,8 \times 10^8$
1	0,198	$2,3 \times 10^8$
2	0,199	$2,3 \times 10^8$
2	0,201	$2,0 \times 10^8$
2	0,203	$2,0 \times 10^7$
3	0,201	$3,2 \times 10^8$
3	0,202	$1,9 \times 10^8$
3	0,216	$3,3 \times 10^8$

Tabelle 48: Ergebnisse zur Erfassung der Keimdichte der Referenzstämme

Referenzstamm	optische Dichte bei 625 nm	Durchschnittliche Bakteriendichte (KbE/ml)
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 35218	0,078	$9,6 \times 10^7$
	0,081	$9,1 \times 10^7$
	0,080	$8,8 \times 10^7$
	0,104	$1,0 \times 10^8$
	0,102	$1,4 \times 10^8$
	0,097	$1,3 \times 10^8$
	0,155	$1,8 \times 10^8$
	0,152	$2,1 \times 10^8$
	0,152	$1,3 \times 10^8$
	0,196	$2,4 \times 10^8$
	0,194	$2,1 \times 10^8$
	0,204	$2,0 \times 10^8$
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	0,082	$9,2 \times 10^7$
	0,080	$6,8 \times 10^7$
	0,080	$7,4 \times 10^7$
	0,107	$1,0 \times 10^8$
	0,101	$1,7 \times 10^8$
	0,099	$1,4 \times 10^8$
	0,146	$1,7 \times 10^8$
	0,149	$1,9 \times 10^8$
	0,150	$1,4 \times 10^8$
	0,204	$1,7 \times 10^8$
	0,202	$1,8 \times 10^8$
	0,020	$2,0 \times 10^8$
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	0,081	$6,8 \times 10^7$
	0,081	$7,6 \times 10^7$
	0,083	$9,7 \times 10^7$
	0,099	$1,0 \times 10^8$
	0,100	$1,2 \times 10^8$
	0,104	$1,2 \times 10^8$
	0,153	$1,8 \times 10^8$
	0,150	$1,4 \times 10^8$
	0,147	$1,6 \times 10^8$
	0,196	$1,9 \times 10^8$
	0,193	$1,8 \times 10^8$
	0,98	$2,0 \times 10^8$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	0,079	$9,6 \times 10^7$
	0,082	$1,0 \times 10^8$
	0,080	$1,0 \times 10^8$
	0,101	$1,5 \times 10^8$
	0,099	$1,0 \times 10^8$
	0,100	$9,5 \times 10^7$
	0,147	$2,2 \times 10^8$
	0,150	$1,9 \times 10^8$
	0,149	$1,2 \times 10^8$
	0,197	$2,5 \times 10^8$
	0,202	$4,3 \times 10^8$
	0,119	$4,0 \times 10^8$

Tabelle 48 Ergebnisse zur Erfassung der Keimdichte der Referenzstämme (Fortsetzung)

Referenzstamm	optische Dichte bei 625 nm	Durchschnittliche Bakteriendichte (KbE/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	0,080	$7,8 \times 10^7$
	0,078	$9,7 \times 10^7$
	0,081	$7,9 \times 10^7$
	0,100	$1,2 \times 10^8$
	0,098	$1,4 \times 10^8$
	0,105	$1,4 \times 10^8$
	0,149	$2,0 \times 10^8$
	0,152	$1,6 \times 10^8$
	0,148	$1,6 \times 10^8$
	0,196	$2,4 \times 10^8$
	0,194	$2,1 \times 10^8$
	0,204	$2,0 \times 10^8$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	0,082	$1,0 \times 10^8$
	0,080	$9,5 \times 10^7$
	0,082	$5,5 \times 10^7$
	0,100	$1,1 \times 10^8$
	0,105	$9,5 \times 10^7$
	0,102	$1,4 \times 10^8$
	0,153	$1,4 \times 10^8$
	0,153	$1,5 \times 10^8$
	0,152	$1,4 \times 10^8$
	0,196	$2,6 \times 10^8$
	0,200	$2,0 \times 10^8$
	0,197	$1,7 \times 10^8$
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	0,080	$4,2 \times 10^7$
	0,082	$5,6 \times 10^7$
	0,083	$5,2 \times 10^7$
	0,102	$9,8 \times 10^7$
	0,106	$1,3 \times 10^8$
	0,105	$9,2 \times 10^7$
	0,147	$1,3 \times 10^8$
	0,150	$1,0 \times 10^8$
	0,155	$1,6 \times 10^8$
	0,195	$1,8 \times 10^8$
	0,207	$2,0 \times 10^8$
	0,198	$1,9 \times 10^8$

10.2 Einbezogene VTEC-Stämme mit Resistenzergebnissen

Tabelle 49: Einbezogene VTEC-Stämme aus Rinderkot mit Resistenzergebnissen

Stamm Nr.	Serovar	isoliert aus	Jahr	vtx1+ vtx2	vtx1	vtx2	eae	Ergebnis Agardiffusion	Ergebnis E-Test
1	O146:H28	Kälberkot	1996	+	-	-	-	S ¹⁾	n.d. ²⁾
2	Ont. ³⁾ :H ⁻	Kälberkot	1996	+	-	-	-	S	n.d.
3	O46:H ⁻	Kälberkot	1996	+	-	-	-	S	n.d.
4	O146:H28	Kälberkot	1996	+	-	-	-	S	n.d.
5	O116:H ⁺	Kälberkot	1996	-	-	+	-	S	n.d.
6	O-Rau- form:H3	Kälberkot	1996	-	+	-	-	S	n.d.
7	O8:H21	Kälberkot	1996	+	-	-	-	S	n.d.
8	O46:H ⁻	Kälberkot	1996	+	-	-	-	S	n.d.
9	O146:H28	Kälberkot	1996	+	-	-	-	S	n.d.
10	O118:H ⁻	Kälberkot	1993	-	+	-	+	R ⁴⁾ : AM	R: AM
11	O118:H ⁻	Kälberkot	1994	-	+	-	+	R: AM, TE	R: AM, TE
12	O118:H ⁻	Kälberkot	1994	-	+	-	+	R: AM, SXT, TE	R: AM, SXT, TE
13	O118:H ⁻	Kälberkot	1989	-	+	-	+	R: AM, GM, SXT, TE	R: AM, GM, SXT, TE
14	O118:H ⁻	Kälberkot	1989	-	+	-	+	R: GM, TE	R: GM, TE
15	O157:H7	Kälberkot (Ägypten)	1996	-	-	+	+	S	n.d.
16	"OX ⁵⁾ 177": H ⁺	Kälberkot (Enteritis)	1990	-	-	+	+	R: TE	R: TE
17	O117:H ⁺	Rinderkot	1996	+	-	-	-	S	n.d.
18	O88:H ⁺	Rinderkot	1996	+	-	-	-	S	n.d.
19	O113:H ⁺	Rinderkot	1996	-	-	+	-	S	n.d.
20	O82:H ⁺	Rinderkot	1996	-	-	+	-	S	n.d.
21	O117:H ⁺	Rinderkot	1996	+	-	-	-	S	n.d.
22	O111:H ⁻	Rinderkot	1996	-	+	-	+	R: AM, GM, TE, NA	R: AM, GM, TE, NA
23	O111:H2	Rinderkot	1996	-	+	-	+	R: AM, GM, TE, NA	R: AM, GM, TE, NA
24	O26:H11	Rinderkot	1996	-	+	-	+	S	n.d.
25	O103:H2	Rinderkot	1996	-	+	-	+	I ⁶⁾ : TE	I: TE
26	O103:H2	Rinderkot	1996	-	+	-	+	S	n.d.
27	O103:H2	Rinderkot	1996	-	+	-	+	S	n.d.
28	O84:NM ⁷⁾	Rinderkot	1996	-	+	-	+	S	n.d.
29	O84:H ⁻	Rinderkot	1996	-	+	-	+	S	n.d.
30	O118:H ⁻	Rinderkot	1996	+	-	-	+	R: AM, TE	R: AM, TE
31	O118:H ⁻	Rinderkot	1996	+	-	-	+	R: AM, TE	R: AM, TE
32	O95:H4	Rinderkot	1997	+	-	-	-	S	n.d.
33	O118:H ⁻	Rinderkot	1997	-	+	-	+	R: AM, TE	R: AM, TE
34	O156:H ⁻	Rinderkot	1997	-	-	-	+	S	n.d.
35	O26:H ⁺	Rinderkot	1997	-	+	-	+	R: TE	R: TE
36	O156:H ⁺	Rinderkot	1997	-	-	-	+	S	n.d.

Stamm Nr.	Serovar	isoliert aus	Jahr	vtx1+ vtx2	vtx1	vtx2	eae	Ergebnis Agardiffusion	Ergebnis E-Test
37	O75:H8	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
38	O136:H19	Rinderkot	1987	-	+	-	-	S	n.d.
39	O113:H21	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
40	O113:H21	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
41	O156:H21	Rinderkot	1987	-	+	-	+	S	n.d.
42	O39:H40	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
43	O139:H8	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
44	O136:H19	Rinderkot	1987	-	+	-	-	S	n.d.
45	O116:H21	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
46	O157:H7	Rinderkot	1987	-	-	+	+	S	n.d.
47	O157:H7	Rinderkot	1987	-	-	+	+	S	n.d.
48	O3:H ⁻	Rinderkot	1987	-	+	-	-	S	n.d.
49	O3:H ⁻	Rinderkot	1987	-	+	-	-	S	n.d.
50	O113:H21	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
51	O116:H21	Rinderkot	1987	+	-	-	-	S	n.d.
52	O116:H21	Rinderkot	1987	+	-	-	-	S	n.d.
53	O113:H21	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
54	O113:H21	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
55	O113:H21	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
56	Orough:H18	Rinderkot	1987	+	-	-	-	S	n.d.
57	Orough:H18	Rinderkot	1987	+	-	-	-	S	n.d.
58	O126:H20	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
59	O126:H20	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
60	O126:H21	Rinderkot	1987	-	-	+	-	S	n.d.
61	O157:H7	Rinderkot	1987	-	-	+	+	S	n.d.
62	On.t.:H16	Rinderkot	1988	-	-	+	-	S	n.d.
63	O22:H8	Rinderkot	1988	-	-	+	-	S	n.d.
64	O22:H8	Rinderkot	1988	-	-	+	-	S	n.d.
65	O82:H8	Rinderkot	1988	+	-	-	-	S	n.d.
66	O116:H21	Rinderkot	1988	+	-	-	-	S	n.d.
67	O82:H8	Rinderkot	1988	+	-	-	-	S	n.d.
68	O116:H21	Rinderkot	1988	+	-	-	-	S	n.d.
69	O116:H21	Rinderkot	1988	+	-	-	-	S	n.d.
70	O105:H18	Rinderkot	1988	-	+	-	-	S	n.d.
71	On.t.:H29	Rinderkot	1988	-	-	+	-	S	n.d.
72	On.t.:H29	Rinderkot	1988	-	-	+	-	S	n.d.
73	O104:H21	Rinderkot	1988	+	-	-	-	S	n.d.
74	O116:H21	Rinderkot	1988	-	+	-	-	S	n.d.
75	O82:H8	Rinderkot	1988	+	-	-	-	S	n.d.
76	O82:H40	Rinderkot	1988	+	-	-	-	S	n.d.
77	O116:H21	Rinderkot	1988	+	-	-	-	S	n.d.
78	O116:H21	Rinderkot	1988	+	-	-	-	S	n.d.
79	O91:H10	Rinderkot	1988	-	-	+	-	S	n.d.
80	O157:H7	Rinderkot	1997	-	-	+	+	S	n.d.
81	O157:H ⁻	Rinderkot	1997	+	-	-	+	S	n.d.
82	O157:H ⁻	Rinderkot	1997	+	-	-	+	S	n.d.

Stamm Nr.	Serovar	isoliert aus	Jahr	vtx1+ vtx2	vtx1	vtx2	eae	Ergebnis Agardiffusion	Ergebnis E-Test
83	O113:H21	Rinderkot	2000	-	-	+	-	S	n.d.
84	On.t.:H8	Rinderkot	2000	-	-	+	-	S	n.d.
85	O22:H8	Rinderkot	2000	+	-	-	-	S	n.d.
86	O22:H8	Rinderkot	2000	+	-	-	-	S	n.d.
87	On.t.:H49	Rinderkot	2000	-	-	+	-	S	n.d.
88	O91:H-	Rinderkot	2000	+	-	-	-	S	n.d.
89	O91:H-	Rinderkot	2000	+	-	-	-	S	n.d.
90	O22:H8	Rinderkot	2000	+	-	-	-	S	n.d.
91	O157:H7	Rinderkot	1999	-	+	-	+	S	n.d.
92	O157:H7	Rinderkot	1999	-	-	+	+	S	n.d.
93	O157:H-	Rinderkot	1999	-	-	+	+	S	n.d.
94	O157:H7	Rinderkot	1999	-	-	+	+	S	n.d.
95	O157:H7	Rinderkot	1999	-	-	+	+	S	n.d.
96	O157Aggl. ⁸⁾	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
97	O157:H ⁺	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
98	O157:H ⁺	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
99	O157:H ⁺	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
100	O157:H ⁺	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
101	O157:H ⁺	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
102	O157:H ⁺	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
103	O157:H ⁺	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
104	-	Rinderkot	2001	+	-	-	-	S	n.d.
105	O157:H ⁺	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
106	O157:H ⁺	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
107	O157:H7	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
108	O157:H ⁺	Rinderkot	2001	-	-	+	+	S	n.d.
109	O32:H8	Rinderkot	1996	-	-	+	-	S	n.d.
110	O77:H18	Rinderkot	1996	-	-	+	-	S	n.d.
111	O73:H18	Rinderkot	1997	+	-	-	-	S	n.d.
112	O62:H49	Rinderkot	1997	+	-	-	-	S	n.d.
113	O155:H ⁺	Rinderkot	1997	-	-	+	-	R: AMC; I: AM	R: AMC; I: AM
114	O129:H ⁺	Rinderkot	1997	-	-	+	-	S	n.d.

¹⁾ sensibel³⁾ nicht typisierbar (nontypeable)⁵⁾ nicht klassifiziert (unclassified)⁷⁾ non motile²⁾ nicht durchgeführt⁴⁾ resistent⁶⁾ intermediär-empfindlich⁸⁾ agglutiniert

rote Schrift: resistente Stämme

blaue Schrift: intermediär-empfindliche Stämme

Tabelle 50: Einbezogene VTEC-Stämme aus Lebensmitteln mit Resistenzergebnissen

Stamm Nr.	Serovar	isoliert aus	Jahr	vtx1 + vtx2	vtx1	vtx2	eae	Ergebnis Agar- diffusion	Ergebnis E-Test
1	O8:H-/ O113:H ⁻	Rindfl.r. f. FP ¹⁾	1996	-	-	+	-	S ²⁾	n.d. ³⁾
2	O22:H8	Rindfl.r. f. FP	1996	+	-	-	-	S	n.d.
3	O14:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1996	+	-	+	-	S	n.d.
4	O17:H18	Rindfl.r. f. FP	1997	-	-	+	-	S	n.d.
5	O74:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1997	-	-	+	-	S	n.d.
6	O74:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1997	-	+	+	-	S	n.d.
7	O113:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1997	+	-	-	-	R ⁴⁾ : TE	R: TE
8	O8:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1997	-	-	+	-	S	n.d.
9	O23:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1997	-	+	-	-	S	n.d.
10	O62:H30	Rindfl.r. f. FP	1997	-	-	+	-	S	n.d.
11	Rauhform:H23	Rindfl.r. f. FP	1997	+	-	-	-	S	n.d.
12	O46:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1997	-	-	+	-	S	n.d.
13	Ont. ⁵⁾ :H24	Rindfl.r. f. FP	1997	-	-	+	-	S	n.d.
14	O65:H20	Rindfl.r. f. FP	1997	-	-	-	+	S	n.d.
15	O62:H8	Rindfl.r. f. FP	1997	+	-	-	-	S	n.d.
16	O157:H7	Rindfl.r. f. FP	1997	-	-	+	+	R: AM	R: AM
17	O7:H16/ Ont.:H16	Rindfl.r. f. FP	1997	-	+	-	-	R: SXT, TE	R: SXT, TE
18	O46:H8	Rindfl.r. f. FP	1997	+	-	-	-	S	n.d.
19	O113:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1997	-	-	+	-	R: SXT, TE	R: SXT, TE
20	O62:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1997	+	-	-	-	S	n.d.
21	O113:H4	Rindfl.r. f. FP	1998	-	-	+	-	S	n.d.
22	O17:H18	Rindfl.r. f. FP	1998	-	-	+	-	S	n.d.
23	Ont.:H8	Rindfl.r. f. FP	1998	-	-	+	-	S	n.d.
24	O113:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1998	+	-	-	-	R: TE	R: TE
25	O22:H8	Rindfl.r. f. FP	1998	+	-	-	-	S	n.d.
26	O22:H8	Rindfl.r. f. FP	1998	+	-	-	-	R: AM, TE	R: AM, TE
27	O91:H21	Rindfl.r. f. FP	1998	+	-	-	-	S	n.d.
28	Ont.:H19	Rindfl.r. f. FP	1998	+	-	-	-	S	n.d.
29	O82:H8	Rindfl.r. f. FP	1998	+	-	-	-	S	n.d.
30	O113:H21	Rindfl.r. f. FP	1998	-	-	+	-	S	n.d.
31	Ont.:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1998	+	-	-	-	S	n.d.
32	O156:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1998	-	+	-	+	S	n.d.
33	O156:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1998	-	+	-	+	S	n.d.
34	O153:H25	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
35	Ont.:H2	Rindfl.r. f. FP	1999	+	-	-	-	S	n.d.
36	O113:H21	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
37	O21:H21	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
38	Ont.:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	+	-	R: TE	R: TE
39	O76:H7	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	-	+	S	n.d.

Stamm Nr.	Serovar	isoliert aus	Jahr	vtx1 + vtx2	vtx1	vtx2	eae	Ergebnis Agar- diffusion	Ergebnis E-Test
40	O113:H21	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
41	Ont.:H21	Rindfl.r. f. FP	1999	+	-	-	-	S	n.d.
42	O113:H21	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
43	Ont.:H8	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
44	O91:H21	Rindfl.r. f. FP	1999	+	-	-	-	R: AM	R: AM
45	Ont.:H2	Rindfl.r. f. FP	1999	+	-	-	-	S	n.d.
46	Ont.:H2	Rindfl.r. f. FP	1999	+	-	-	-	S	n.d.
47	O113:H6	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	-	+	S	n.d.
48	O113:H6	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	-	+	S	n.d.
49	O113:H6	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	-	+	S	n.d.
50	O113:H6	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	-	+	S	n.d.
51	O103:H42	Rindfl.r. f. FP	1999	+	-	-	-	S	n.d.
52	O39:H48	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
53	O109:H4/ Ont.:H4	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	+	-	R: AM	R: AM
54	O22:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	1999	+	-	-	-	S	n.d.
55	Osp. ⁶⁾ :H4	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	+	-	R: AM	R: AM
56	O22:H8	Rindfl.r. f. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
57	Ont.:H7	Rindfl.r. f. FP	2000	+	-	-	-	S	n.d.
58	O157:H ⁻	Rindfl.r. f. FP	2000	+	-	-	+	S	n.d.
59	O82:H8	Rindfl.r. f. FP	2001	+	-	-	-	S	n.d.
60	O157:NM	Rindfl.r. f. FP	2001	-	+	-	+	S	n.d.
61	O157:H ⁺	Rindfl.r. f. FP	2001	+	-	-	+	S	n.d.
62	Ont:H10	Rindfl.r. f. FP	2001	-	+	-	-	R: AM, TE	R: AM, TE
63	O113:H4	Rindfl. FP ⁷⁾	1999	+	-	-	-	R: SXT	R: SXT
64	O113:H21	Rindfl. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
65	O113:H21	Rindfl. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
66	O157:H7	Rindfl. FP	1999	-	-	+	+	S	n.d.
67	Ont.:H7	Rindfl. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
68	Ont.:H7	Rindfl. FP	1999	-	-	+	-	S	n.d.
69	O22:H8	Rindfl. FP	1999	+	-	-	-	S	n.d.
70	O109:H4	Rindfl. FP	1999	-	-	+	-	R: AM	R: AM
71	O109:H4	Rindfl. FP	1999	-	-	+	-	R: AM	R: AM
72	Ont.:H4	Rindfl. FP	1999	-	-	+	-	R: AM	R: AM
73	O171:H2	Rindfl. FP	2000	-	-	+	-	S	n.d.
74	O128:H2	Rindfl. FP	2000	-	-	-	+	S	n.d.
75	O113:H ⁺	Rindfl. FP	2001	-	-	+	-	R: TE	R: TE
76	O113:H ⁺	Rindfl. FP	2001	-	-	+	-	S	n.d.
77	O26:H ⁻	Rindfl. FP	2001	-	+	-	+	S	n.d.
78	O15:H2	Rindfl. FP	2001	-	n.d.	n.d.	+	S	n.d.
79	O157:H ⁺	Rindfl. FP	2001	-	n.d.	+	+	R: AM	R: AM
80	O103:H2	Rindfl. FP	2002	-	+	n.d.	+	R: SXT	R: SXT
81	O157:H7	Rindfl. FP, ungewürzt	2002	-	-	+	+	S	n.d.

Stamm Nr.	Serovar	isoliert aus	Jahr	vtx1 + vtx2	vtx1	vtx2	eae	Ergebnis Agar- diffusion	Ergebnis E-Test
82	O157:H7	Rindfl. FP, ungewürzt	2002	-	-	+	+	S	n.d.
83	O157:H7	Rindfl. FP, ungewürzt	2002	-	-	+	+	S	n.d.
84	O157:H7	Rindfl. FP, ungewürzt	2002	-	-	+	+	S	n.d.
85	O157:H ⁻	Rindfl. FP	2002	-	n.d.	n.d.	+	S	n.d.
86	OX ⁸ 3:NM	Tatar	2001	-	-	+	-	R: TE	R: TE
87	Ont.:H28	Tatar	2000	+	+	+	-	S	n.d.
88	O15:H2	Rindfleisch	2001	-	-	-	+	S	n.d.
89	O117:H ⁺	Rindfl. (Rohm. f. Wursth.) ⁹⁾	2001	+	-	-	-	S	n.d.
90	O113:H4	Rinder- hackfl. ¹⁰⁾	1998	+	-	-	-	S	n.d.
91	Ont.:H18	Rinderhackfl.	1998	+	-	-	-	S	n.d.
92	O113:H21	Rinderhackfl.	1998	-	-	+	-	S	n.d.
93	O146:H21	Rinderhackfl.	1998	+	-	-	+	S	n.d.
94	Ont.:H ⁻	Rinderhackfl.	1997	-	-	+	-	S	n.d.
95	O22:H8	Rinderhackfl.	1997	+	-	-	-	S	n.d.
96	O22:H ⁻	Rinderhackfl.	1996	+	-	-	-	S	n.d.
97	O73:H ⁻	Rinderhackfl.	1996	+	-	-	-	S	n.d.
98	O22:H ⁻	Rinderhackfl.	1996	+	-	-	-	S	n.d.
99	O70:H ⁻	Rinderhackfl.	1996	-	-	-	+	S	n.d.
100	Ont.:H ⁻	Rinderhackfl.	1996	-	-	-	+	R: TE	R: TE
101	O22:H5	Rinderhackfl.	1996	+	-	-	-	R: TE	R: TE
102	O8:H ⁻	Rinderhackfl.	1997	-	-	+	-	R: TE	R: TE
103	O8:H ⁻	Rinderhackfl.	1997	-	-	+	-	R: TE	R: TE
104	O103:H2	Rindfleisch	2001	-	+	n.d.	+	S	n.d.
105	O8:H27	Rindfleisch	1996	-	-	+	-	S	n.d.
106	O157:H7	Rindfleisch	1996	+	-	-	+	S	n.d.
107	O157:H7	Rindfleisch	1997	-	-	+	+	S	n.d.
108	O113:H ⁻	Rinderhackfl.	1998	-	-	+	-	S	n.d.
109	O6:H10	Rinderhackfl.	1998	-	+	-	-	S	n.d.
110	O113:H4	Rinderhackfl.	1999	-	-	+	-	R: TE	R: TE
111	O1:H2	Rinderhackfl.	1997	-	-	+	-	S	n.d.
112	O15:H17	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	n.d.	+	S	n.d.
113	O15:H2	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
114	O156:H47	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
115	O156:H47	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
116	O56:H ⁻	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
117	O1:H2	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
118	O156:H47	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
119	O156:H47	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
120	O156:H47	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.

Stamm Nr.	Serovar	isoliert aus	Jahr	vtx1 + vtx2	vtx1	vtx2	eae	Ergebnis Agar- diffusion	Ergebnis E-Test
121	O156:H47	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
122	O156:H8	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
123	O1:H2	Rinderhackfl.	1997	-	-	+	-	S	n.d.
124	O56:H ⁻	Rinderhackfl.	1997	-	-	+	-	S	n.d.
125	O26:H11	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
126	O26:H11	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
127	O156:H47	Rinderhackfl.	1997	-	n.d.	-	+	S	n.d.
128	O157	Rindfleisch	2000	+	-	-	+	S	n.d.
129	O22:H8 /O22:H ⁺	Rohmilch	1995	+	-	-	-	S	n.d.
130	O157:H ⁻	Rindermilch	1997	-	-	+	+	S	n.d.
131	O157	Rindermilch	1997	+	-	-	+	S	n.d.
132	O157:H7	Rindermilch	1998	-	-	+	+	S	n.d.
133	O157:H ⁻	Rohmilch	1995	-	-	+	+	S	n.d.
134	O17:H ⁻	Rohmilch	1996	-	-	+	-	S	n.d.
135	O157:H7	Rohmilch	1996	+	-	-	+	S	n.d.
136	O157:H7	Rohmilch	1997	-	-	+	+	S	n.d.
137	O138:H8/ /Ont.:H ⁺	Vorzugsmilch	1996	-	-	+	-	S	n.d.
138	O157:H ⁻	Vorzugsmilch	1996	-	-	+	+	S	n.d.
139	O91:H21	Rohmilch- sammelprobe	1999	+	-	-	-	S	n.d.
140	O23:H15	Rinderroh- milchkäse	1997	-	-	+	-	S	n.d.

¹⁾ Rindfleischrohstoff für Fertigprodukt

²⁾ sensibel

³⁾ nicht durchgeführt

⁴⁾ resistent

⁵⁾ nicht typisierbar (nontypeable)

⁶⁾ Ospecific polysaccharid

⁷⁾ Rindfleisch Fertigprodukt

⁸⁾ nicht klassifiziert (unclassified)

⁹⁾ Rindfleisch (Rohmaterial für Wurstherstellung)

¹⁰⁾ Rinderhackfleisch

rote Schrift: resistente Stämme

blaue Schrift: intermediär-empfindliche Stämme

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus den veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Bad Soden, den 18.05.2009

Nadine Aßmus

Danksagung

Abschließend möchte ich allen meinen herzlichen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Bülte für die Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte Unterstützung sowie fachliche Beratung und Betreuung während der Anfertigung der Arbeit und ebenso für die vielfältigen wissenschaftlichen Weiterbildungsmöglichkeiten am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde.

Ich bedanke mich bei allen Kolleginnen und Kollegen dieses Instituts sowohl für die Hilfe im Labor als auch am Schreibtisch sowie für die schöne Atmosphäre. Dabei möchte ich mich in besonderem Maß bei Frau Claudia Walter für die Einarbeitung in die *E. coli*-Stammsammlung sowie bei Frau Cornelia Dürrschmidt und Frau Brigitte Marx für die weitläufigen Hilfestellungen bedanken.

Ferner danke ich Herrn Dr. K. Failing sowie Frau Sparenberg für die engagierte Beratung und die geduldig gewährte Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Für das sehr sorgfältige sowie zeitintensive Lesen und Korrigieren danke ich meiner Mutter Regina Sachse, Frank Schneider sowie Stefanie Rosa, die bei etwaigen Problemen immer eine Aufmunterung parat hatte und ohne die mir unser Zimmer sehr leer vorgekommen wäre.

Bei meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich herzlich für ihr unendliches Verständnis bezüglich der häufig geringen verbleibenden Zeit und den häufigen Absagen zu verschiedenen Terminen sowie für ihre bedingungslose Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Edmund Aßmus und Regina Sachse für die vielfältige emotionale sowie auch finanzielle Unterstützung, ohne die mir die Durchführung dieser Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre. Ich möchte ihnen für ihre Geduld sowie für ihr unerschütterliches Vertrauen danken.

Ein spezielles Dankeschön gilt Frank Schneider, der immer unendliche Geduld und Ruhe bewahrt hat, mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich immer wieder liebevoll ermutigt und unterstützt hat.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
 STAUFENBERGRING 15
 D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
 redaktion@doktorverlag.de
 www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5462-8



9 17 8 3 8 3 5 1 9 5 4 6 2 5 1

© photoGraphie - Fotolia.com